



**Cláudio Henrique dos
Santos**

**Estudo Protocolar por RMN na Análise do
Metaboloma das *Saccharomyces cerevisiae***



Universidade de Aveiro Departamento de Química
2009

**Cláudio Henrique dos
Santos**

**Estudo Protocolar por RMN na Análise do
Metaboloma das *Saccharomyces cerevisiae***

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Métodos Biomoleculares, realizada sob a orientação científica do Dr. Brian James Goodfellow, Professor Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Para Ti Também...

o júri

Presidente

Dr. Pedro Miguel Dimas Neves Domingues

Professor Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Dr. Brian James Goodfellow

Professor Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Dr. Pedro Miguel António Lamosa

Investigador Auxiliar do ITQB da Universidade Nova de Lisboa

Agradecimentos

Chega ao fim mais uma etapa da minha vida e não me poderia esquecer de agradecer a todos os que de alguma forma me acompanharam e permitiram este trabalho, especialmente aos meus amigos e colegas de trabalho. Também gostava de agradecer a todos os que fazem parte do “pequeno”, mas grande ao mesmo tempo, grupo da Metabonómica da Universidade de Aveiro.

É verdade, sem a sua ajuda e sem os seus ensinamentos, tudo isto não seria possível para mim. Muito obrigado Professor Brian. Mais uma etapa concluída, venha a próxima.

Não poderia esquecer de agradecer ao Professor Manuel Santos e às pessoas do laboratório de mRNA, especialmente ao João Paredes por todo o esforço e paciência para comigo.

À Universidade de Aveiro e às injustiças do Departamento de Química o meu agradecimento, foi mais um passo dado nesta “universidade de excelência”.

E por fim, agradeço-te a ti por teres acreditado em mim, e me teres acompanhado ao longo desta etapa de forma paciente e compreensiva.

palavras-chave

Saccharomyces cerevisiae, erros de tradução; metabolismo; metabonómica; extracção metabólica; PCA; NMR.

Resumo

Este trabalho focou-se na optimização de um processo que possibilitasse a obtenção de perfis globais metabólicos, por NMR, e na identificação do maior número de metabolitos intracelulares das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* com erros de tradução. O método experimental a utilizar na extracção de metabólicos intracelulares em células eucarióticas para análise por NMR, deve preencher determinados requisitos: rendimento elevado, reprodutibilidade, simplicidade e rapidez. Existem vários factores que influenciam este estudo. Com o intuito de encontrar um método eficaz, analisaram-se todas as variáveis a controlar, estudando-se: os meios de crescimento; as curvas de crescimento, de forma a saber onde recolher as células ao longo do seu crescimento; e alguns procedimentos de extracção dos metabolitos. Obtidos os extractos metabólicos (<5 kDa) através de diferentes métodos, adquiriram-se espectros 1D e, para amostras seleccionadas, 2D ^1H - ^{13}C -HSQC. Usando a análise por PCA identificaram-se algumas variáveis experimentais, posteriormente controladas de forma a diminuir a variabilidade entre amostras e encontrar um processo de obtenção de extractos metabólicos eficiente. O método optimizado apresenta semelhanças com o método utilizado por Lewis *et al*, no qual são usadas duas fases de liofilização. Ao fim da primeira liofilização, adicionam-se esferas de vidro (5 mm) aos extractos liofilizados, seguidamente vortexados a seco. Posteriormente é filtrado (< 5 kDa) e liofilizado novamente. Este trabalho também passou pela identificação de um maior número de metabolitos característicos das *Saccharomyces cerevisiae*. Em trabalhos anteriores, o número conhecido é de 40 metabolitos e, no nosso caso, são apresentados cerca de 60 compostos claramente identificados recorrendo à técnica de NMR.

Keywords

Saccharomyces cerevisiae, mistranslation; metabolism; metabonomics; metabolites extraction; PCA; NMR.

Abstract

This work focused on the optimization of an experimental method for obtaining global metabolic profiles by NMR and on the identification of the maximum number of intracellular metabolites present in yeast, particularly *Saccharomyces cerevisiae* with high levels of mistranslation. Optimization of experimental methods used for the extraction of intracellular metabolites in eukaryotic cells using NMR, must meet fundamental requirements like high yield, reproducibility, simplicity and it should also be straightforward. Optimization of an experimental process is not always easy to optimize, since many factors can affect it. In order to achieve our objectives, the experimental variables were minimized by studying: the growth media; the growth curves, in order to recognize when to collect the cells; and the metabolite extraction procedures. After obtaining the metabolic extracts (<5 kDa) using different methods, 1D spectra were acquired and, for selected samples, 2D ^1H - ^{13}C -HSQC spectra were also acquired. Using unsupervised PCA analysis, important variables were identified and, subsequently, controlled in order to reduce the variability between samples and optimise an efficient process to obtain metabolic extracts. The final optimised experimental method, similar to that of Lewis et al., consists in two stages of lyophilisation. After the first lyophilisation, glass beads (5 mm) were added to the lyophilised extracts and then submitted to vigorous dried vortex. After dissolved in a buffer, the extracts were filtered (<5 kDa) and again lyophilized. As previously said, this work also consisted in the identification of a maximum number of characteristic metabolites present in yeast. The maximum number of identified metabolites was ca 40, as showed in previous studies. However, in our work, we were able to clearly identify ca. 60 compounds using NMR.

Índice Geral

Agradecimentos	vi
Resumo	vii
Abstract	viii
ÍNDICE GERAL.....	1
ABREVIATURAS.....	3
ÍNDICE DE FIGURAS.....	5
ÍNDICE DE TABELAS.....	7
CAPÍTULO I.....	9
INTRODUÇÃO	11
Metabonómica.....	13
As aplicações da metabonómica.....	16
Ferramentas da metabonómica.....	17
O FENÓMENO DA RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR	20
Fundamentos do NMR.....	20
Diferenças no processo de aquisição dos espectros 1D e 2D	22
Espectrómetros de ressonância magnética nuclear	24
EVOLUÇÃO DOS MÉTODOS NA PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	26
Passos na extracção dos metabolitos	27
LEVEDURAS <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>.....	29
Acompanhamento do crescimento de uma população de leveduras	30
<i>MISTRANSLATION</i> – ERROS DE TRADUÇÃO	34
Processo de inserção do tRNA mutante	34
ESTUDO QUIMIOMÉTRICO.....	38
PCA – Análise de Componentes Principais.....	39
CAPÍTULO II.....	41
METODOLOGIA.....	43
TRANSFORMAÇÃO DE ALTA EFICIÊNCIA EM <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	44
MEIOS DE CULTURA.....	44
Processo de crescimento celular	44
OPTIMIZAÇÃO DO PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL – MÉTODOS DE EXTRACÇÃO – PRIMEIRA PARTE	45
Método das Esferas de Vidro	47
Método de Liofilização.....	47

Método da Liofilização com Esferas de Vidro a Seco	48
OPTIMIZAÇÃO DO PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL – SEGUNDA PARTE	50
CURVAS DE CRESCIMENTO	50
Crescimentos das células.....	51
ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR	52
PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA NMR.....	54
Parâmetros para a obtenção dos espectros: espectrómetro de 800 MHz.....	54
Parâmetros para a obtenção dos espectros: espectrómetro de 500 MHz.....	55
ANÁLISE QUIMIOMÉTRICA.....	56
Análise de Componentes Principais	56
CAPÍTULO III.	59
RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
VARIÁVEIS EXPERIMENTAIS - MEIOS E CULTURAS	62
CURVAS DE CRESCIMENTO	73
MÉTODOS DE EXTRACÇÃO DOS METABOLITOS	84
ESPECTROS DE NMR E IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS/METABOLITOS NOS EXTRACTOS DE LEVEDURAS	93
ANÁLISE QUIMIOMÉTRICA – PCA – CUIDADOS A TER	105
TRABALHO FUTURO – PERFIS METABOLÓMICOS.....	108
CAPÍTULO IV.....	111
CONCLUSÃO	113
BIBLIOGRAFIA.	117

Abreviaturas

COSY	Correlação Espectroscópica Homonuclear Bidimensional
CUG	Codão constituído por uma sequencia linear de três nucleótidos: Citosina, Uracil e Guanina
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
FID	Sinal de Decaímento Livre
HMBC	Correlação Heteronuclear de Multiplas Ligações
HMQC	Correlação Heteronuclear de Multiplo <i>Quantum</i>
HSQC	Correlação Heteronuclear de <i>Quantum</i> Simples
TSP	Trimetilsililpropionato
kDa	KiloDalton
LC-MS	Cromatografia Líquida-Espectrometria de Massa
MHz	MegaHertz
mRNA	Ácido Ribonucleico Mensageiro
MS	Espectrometria de Massa
NAD ⁺ /NADH	Par redox Dinucleótido Nicotinamida Adenina
NMR	Resonância Magnética Nuclear
NOESY	Espectroscopia de Amplificação Nuclear de Overhauser
OD	Densidade Óptica
PC	Componentes Principais
PCA	Análise de Componentes Principais
pKa	Logaritmo de Base 10 da Constante de Acidez
PLS	Método Regressão Parcial em Mínimos Quadrados
PLS-DA	PLS Análise Discriminante
ppm	Partes por Milhão
rRNA	Ácido Ribonucleico Ribossómico
SIMCA	Modelação Suave e Independente da Classificação Analógica
TOCSY	Espectro de NMR de Correlação Total Multidimensional
tRNA	Ácido Ribonucleico Transferência
tRNA-CAG	Ácido Ribonucleico Transferência-Anticodão de Citosina, Adenosina e Guanina

Índice de Figuras

Figura 1 – Estudo e funcionamento celular a nível molecular.....	13
Figura 2 – Quimiometria na metabolómica / metabonómica.....	18
Figura 3 – Energia do <i>spin</i> nuclear para um núcleo com $I = 1/2$ em função de um campo magnético B_0	21
Figura 4 – Sequência no tempo duma experiência de impulsos 1D.	23
Figura 5 – Sequência no tempo duma experiência de impulsos 2D.	23
Figura 6 – Imagem de <i>SEM</i> das leveduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	29
Figura 7 – Fases do crescimento microbiano.	31
Figura 8 – Método utilizado na criação dos erros de tradução.	35
Figura 9 – Plasmídeo G_{33} (pUKC702; Santos MAS, 1999).	35
Figura 10 – Leucine anticodon, $tRNA_{CAG}^{Ser}$	36
Figura 11 – Percentagens de incorporação da serina e leucina para a posição CUG.....	37
Figura 12 – Plasmídeo Controlo (pUKC707; Santos MAS, 1999).....	37
Figura 13 – Procedimento de análise metabonómica por ressonância magnética nuclear.....	43
Figura 14 – Esquema inicial utilizado na preparação dos meios para os crescimentos das células com os respectivos plasmídeos.	45
Figura 15 – Procedimento do Método de Liofilização.	48
Figura 16 – Procedimento do Método Seco com Esferas de Vidro.	49
Figura 17 – Esquema final utilizado na preparação dos meios para os crescimentos das células com os respectivos plasmídeos.	50
Figura 18 – Diagrama dos espectros adquiridos nos dois diferentes espectrómetros, 500 e 800 MHz.	52
Figura 19 – Procedimento de análise de dados de NMR.	56
Figura 20 – Gráfico de <i>Scores</i> da Análise por PCA mostrando a variabilidade entre amostras.	62
Figura 21 – Placas de Petri com os respectivos crescimentos das células com os diferentes plasmídeos.	63
Figura 22 – Colónias de células do plasmídeo Controlo.	64
Figura 23 – PCA das amostras da fase exponencial das células Controlo e G_{33}	65
Figura 24 – Teste de armazenamento das amostras da fase exponencial, gráficos dos <i>scores</i> da análise por PCA.	66
Figura 25 – Gráficos dos <i>Loadings</i> da análise por PCA para o teste de armazenamento das amostras.	67
Figura 26 – Gráfico dos <i>Scores</i> com os vários meios, meio rico e meio mínimo.....	70
Figura 27 – Gráfico de <i>Loadings</i> das amostras Controlo do meio rico e mínimo.	71

Figura 28 - Gráfico de <i>Scores</i> assinalando a separação das amostras preparadas em diferentes Condições....	72
Figura 29 – Espectro de uma amostra Controlo recolhida a uma OD de 1.66.	73
Figura 30 – Teste das ODs das células controlo.	76
Figura 31 – Curva de Crescimento das Células Controlo	77
Figura 32 – Curva de Crescimento das Células G ₃₃	78
Figura 33 – Curva de Crescimento das Células T ₃₃	78
Figura 34 – Curva de crescimento das amostras Controlo ao longo da curva de Crescimento.	80
Figura 35 – Gráfico de <i>scores</i> obtido das amostras Controlo ao longo da curva de crescimento.	80
Figura 36 – Gráfico de <i>Loadings</i> das amostras Controlo ao longo da curva de crescimento.	81
Figura 37 – Gráfico dos <i>Scores</i> demonstrando as amostras liofilizadas em diferentes passos.....	87
Figura 38 – Espectro 1D ¹ H 500 MHz NMR da amostra Controlo pelo método de extracção Liofilização com água.	88
Figura 39 – Espectro 1D ¹ H 500 MHz NMR da amostra Controlo pelo método de extracção liofilização com esferas de vidro a seco.	88
Figura 40 – Gráfico de <i>Scores</i> das amostras Controlo com métodos de extracção de metabolitos diferentes.	89
Figura 41 – Espectro 1D ¹ H 500 MHz NMR da amostra Controlo da fase estacionária para o segundo momento de extracção, utilizando o método de liofilização com esferas de vidro a seco.	91
Figura 42 – Espectros 1D ¹ H 500 MHz NMR das diferentes células na fase exponencial e estacionária, em meio rico.	93
Figura 43 – Espectro TOCSY 800 MHz de uma amostra Controlo em meio rico na fase estacionária.	95
Figura 44 – Espectro de Correlação ¹ H / ¹³ C HSQC 800 MHz NMR de uma amostra Controlo em meio rico na fase estacionária	96
Figura 45 – Alguns sinais identificados no programa Sparky.....	98
Figura 46 – Espectro 1D ¹ H 500 MHz de uma amostra Controlo meio rico da fase estacionária com alguns metabolitos identificados.	101
Figura 47 – Espectros de Correlação ¹ H / ¹³ C HSQC 800 MHz NMR das amostras Controlo em meio rico na fase estacionária utilizando técnicas diferentes de extracção dos metabolitos. A) Método de Liofilização. B) Método de Liofilização com Esferas de Vidro a Seco.	103
Figura 48 – Resultado obtido na análise por PCA no programa Amix 3.8.4	105
Figura 49 – Variações dos desvios químicos devido ao pH.....	107
Figura 50 – Espectros sobrepostos 2D HSQC 800 MHz da fase exponencial das células Controlo, G ₃₃ e T ₃₃	108

Figura 51 – Espectros sobrepostos 2D HSQC 800 MHz da fase estacionária das células Controlo, G ₃₃ e T ₃₃	109
---	-----

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Médias das massas obtidas nos três métodos utilizados para a extracção dos metabolitos.	46
Tabela 2 - Tabela de ODs de algumas primeiras amostras	74
Tabela 3 - Tabela de ODs de algumas amostras após o estudo	83
Tabela 4 – Concentração dos metabolitos em mM determinados em extractos de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> por espectroscopia NMR 2D 1H - 13C HSQC	97
Tabela 5 – Listagem dos metabolitos identificados dos extractos das células <i>Saccharomyces cerevisiae</i> por espectroscopia	99
Tabela 6 – Listagem dos sistemas spin identificados a partir do espectro TOCSY	102

Capítulo I.

Introdução

Este estudo teve como objectivo otimizar um procedimento experimental de forma a ser possível estudar perfis metabólicos de extractos celulares globais, como os das leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, *S. cerevisiae*, por NMR.

Esta investigação inicia um estudo bastante complexo onde se pretende verificar quais os efeitos que os erros na descodificação do mRNA, durante a tradução, causam ao metabolismo das leveduras *S. cerevisiae*, e relacioná-los com o cancro, o envelhecimento, as doenças auto-imunes e neurodegenerativas [1, 2]. Porém, e em primeiro lugar, deve-se estudar e otimizar um procedimento experimental para a obtenção dos extractos metabólicos intracelulares para que exista reprodutibilidade no método, baixa variabilidade entre amostras, e que seja um método simples e rápido.

As preparações das amostras para estudos metabolómicos por ressonância magnética nuclear, NMR, são habitualmente simples. As amostras poderão ser tanto biofluidos, como células intactas ou mesmo extractos celulares, e a obtenção de cada uma delas difere de caso para caso. Contudo, em certos casos como os extractos metabólicos, a obtenção das amostras tornam-se muito complicada. Existem diversos procedimentos estudados [3-5], mas estes diferem consoante a natureza das amostras e da técnica a utilizar na análise.

Quando o estudo metabolómico incide em extractos celulares deve-se ter atenção à forma como se obtêm esses extractos, ou seja, como se crescem as células, o método a utilizar na extracção dos metabolitos e como guardar e/ou preparar esses extractos para que no final sejam analisados por NMR. Ao longo destas etapas, existem vários parâmetros/factores que devem ser controlados, outros minimizados, e torna-se fundamental estudá-los para a obtenção de um perfil metabólico mais correcto possível. Ocorrendo variações no método de crescimento ou mesmo no método de extracção todo o processo ficará comprometido.

Com o intuito em otimizar um método de obtenção dos extractos globais intracelulares, e posteriormente estudar o metabolismo das leveduras com erros de tradução, cresceram-se as células de *S. cerevisiae* com os respectivos plasmídeos. Estes plasmídeos expressam tRNA mutantes e induzem erros na descodificação do mRNA durante a síntese proteica. Utilizando alguns métodos de extracções globais dos metabolitos, e obtendo os primeiros resultados, observou-se a existência de uma grande variabilidade entre amostras. Através

destes resultados necessitou-se de eliminar essas diferenças entre os perfis dos mesmos plasmídeos, ou seja, identificar as variáveis experimentais a controlar de forma a obter um perfil metabólico idêntico para as células contendo os mesmos plasmídeos.

Estudaram-se alguns detalhes nos vários passos até à obtenção dos extractos. Para o passo do crescimento das células foram estudados: os meios de crescimentos, como é que estes interferem na obtenção dos perfis; e as respectivas curvas de crescimento das células com os respectivos plasmídeos, de forma a saber onde recolher as mesmas ao longo das várias fases de crescimento. No caso da extracção dos metabolitos, foram também testados três métodos, com o objectivo em obter um método eficiente na extracção global dos metabolitos para análise por NMR.

As técnicas usadas neste estudo foram NMR e análise multivariada, sendo a última a análise de componentes principais, PCA. A técnica de NMR envolveu dois espectrómetros diferentes 500 e 800 MHz. Com o espectrómetro de 800 MHz situado no Centro de Ressonância Magnética António Xavier – CERMAX no ITQB em Lisboa, adquiriram-se vários espectros 1D e principalmente 2D para que fosse possível iniciar a identificação dos metabolitos presentes nos extractos. Com o espectrómetro de 500 MHz, situado na Universidade de Aveiro no Departamento de Química em Aveiro, foram adquiridos os espectros 1D para análise multivariada.

Este trabalho também passou pela identificação dos metabolitos intracelulares, até 5 kDa, onde se pretendeu aumentar o número de metabolitos identificados. Até ao momento, cerca de 40 metabolitos foram identificados em trabalhos anteriores e no final deste trabalho este número passou para cerca de 60 metabolitos identificados. Todavia existem mais de 40 sistemas de *spins* por identificar. Futuramente serão combinadas outras técnicas, como o LC-NMR e a espectrometria de massa, MS, de forma a aumentar o número de metabolitos identificados. Mas, para além do perfil metabólico intracelular também pretende-se analisar os metabolitos extracelulares, de forma a obter um perfil completo (intra e extracelular) e identificar os metabolitos que possam passar para o meio de crescimento.

Metabonómica

Durante os anos 1980 e 1990, foi investido muito tempo e esforço na sequenciação do código genético de diversos organismos, com o intuito de se elucidar completamente o mecanismo de funcionamento celular em níveis moleculares. No entanto, após todo este esforço, ficou claro que o conhecimento das sequências de todos os genes de cada organismo não era suficiente sem se compreender todos os mecanismos moleculares de uma célula. Por esta razão, e recorrendo à bioquímica clássica, procuraram-se ferramentas que pudessem auxiliar na elucidação de cada função dos milhares de genes existentes em cada organismo [6].

A função de um gene é determinada quando se identificam todos os seus respectivos produtos genéticos, ou seja, mRNA, proteínas e metabolitos, figura 1 [7]. Com esta necessidade, surge uma nova etapa e um novo estudo, o metaboloma (o mais recente dos *omas*), sendo este o estudo do conjunto de todos os metabolitos (pequenas moléculas, como hormonas, metabolitos secundários, etc...), que podem ser encontrados numa célula/organismo [8].

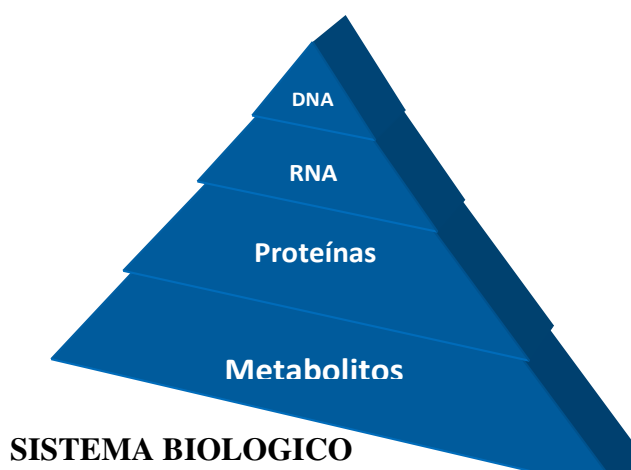


Figura 1 – Estudo e funcionamento celular a nível molecular.

Assomou então um novo vocábulo a metabolómica, *Metabolomics*, que consiste no estudo global de todos os metabolitos produzidos pelos organismos de forma a obter um perfil completo, uma impressão digital química e única [9-12]. Desta forma, a metabolómica tem

como objectivo compreender os organismos vivos de forma integrada e coerente, em vez de olhar para organismos isolados, dissecados em partes moleculares [11].

Por outro lado, surge também o termo metabonómica, *Metabonomics*, que representa uma nova ferramenta muito promissora em áreas tão variadas como a toxicidade, a toxicologia, a genómica, a nutrição e a medicina. No entanto, questionou-se o que é que se entenderia por metabonómica. A definição utilizada para a metabonómica é a quantidade medida de uma resposta metabólica de um sistema vivo a um stress patofisiológico, a modificações genéticas e/ou intervenções nutricionais [7].

Etimologicamente, ómica "*Omics*" significa o estudo global de algo. Assim, a genómica entende-se pelo estudo de todos os genes, a proteómica de todas as proteínas, a transcriptómica de todos os transcriptos, e por fim, a metabolómica o perfil metabólico de uma dada célula, tecido, fluido, órgão, organismo num dado instante. De uma forma geral representa a bioquímica pós-genómica [7].

Existe uma grande variedade de vias metabólicas nos organismos que se relacionam entre si de maneira complexa, de forma a permitir uma regulação adequada. As reacções do metabolismo estão organizadas em vias metabólicas, que são sequências de reacções em que o produto de uma reacção é utilizado como reagente na reacção seguinte [13].

Para o metabolismo, mais precisamente nas reacções metabólicas, as enzimas são vitais porque permitem a realização de reacções desejáveis controlando os processos adjacentes a cada reacção, como também regulam as vias metabólicas em resposta a mudanças no ambiente celular ou a sinais de outras células. Cada enzima pode sofrer regulação da sua actividade, aumentando-a, diminuindo-a ou mesmo interrompendo-a, de modo a modular o fluxo da via metabólica em que se insere. Ocorrendo uma alteração numa das vias metabólicas todas as outras vias ficam alteradas resultando assim num stress à célula ou organismo [14].

Existem diversas patologias associadas às alterações do metabolismo que comprometem as funções celulares, como por exemplo: a osteoporose, a gota e o albinismo. Todas estas doenças se relacionam com o metabolismo. Assim, a osteoporose é devida a uma redução da actividade osteoblástica e consequentemente provoca uma redução na formação da matriz óssea. A gota é também uma das patologias associadas às alterações do metabolismo que se deve à acumulação elevada de ácido úrico no sangue e na urina,

provocando a formação constante de artrites por inflamação das articulações. E por fim, o albinismo, que é causado por uma deficiência da tirosinase necessária à síntese de melanina, que tem como consequência susceptibilidade a queimaduras solares, carcinomas da pele e fotofobia [15].

A metabolómica fundamenta-se muito bem. Relaciona na globalidade todos os outros estudos, “*omics*”, desde os genes às proteínas, e não se restringe somente a uma componente. Por exemplo, nas leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, somando o número de genes (~6,200 genes), de mRNA (~20,000 mRNAs) e de proteínas (~500,000 proteínas), e comparando-os somente com o número de metabolitos (~590 metabolitos, pequenas moléculas), poder-se-á afirmar que este número de metabolitos é bastante inferior [16-18]. Contudo, através dele, é possível relacionar todos os outros estudos referidos. Assim, a metabolómica torna-se num estudo vantajoso onde para num dado instante este proporciona uma espécie de “fotografia instantânea”, ou impressão digital, do estado fisiológico da célula. Pelo qual, através dos perfis obtidos, poder-se-á estudar as variações ou alterações fisiológicas.

Resumindo, o metaboloma reflecte o estado geral de um organismo e a definição mais correcta define a metabonómica como a quantidade medida de uma resposta metabólica de multi parâmetros dinâmicos de um sistema vivo para uma modificação genética ou para um estímulo fisiopatológico. (*Imperial College London, 1990s*).

Embora ainda não exista consenso sobre as diferenças exactas entre metabolómica e metabonómica, e em geral, o termo metabolómica torna-se mais comum [13]. Adverte-se que ao longo este trabalho será utilizado o termo metabonómica, uma vez que se utilizaram células onde ocorrem alterações na tradução do mRNA através dos plasmídeos situados no citoplasma.

As aplicações da metabonómica

Existem diversas aplicações em que a metabonómica poderá contribuir, nomeadamente, na toxicologia e toxicidade, genómica funcional e nutrigenómica.

Para a toxicidade e toxicologia, o perfil metabólico (em particular em amostras de sangue e urina) pode ser usado na detecção de alterações fisiológicas causadas por um produto químico ou uma mistura de produtos químicos [13, 19]. Em muitos casos, as alterações observadas podem estar relacionadas com síndromas específicos, por exemplo: uma lesão específica no fígado ou no rim.

Na genómica funcional, pode constituir uma excelente ferramenta na determinação do fenótipo originado por uma manipulação genética, como deleção ou inserção de um gene [20, 21].

Um exemplo é o Δ PNC1 (Delta PNC1), onde o delta significa ausência/deleção do gene PNC1. Em estudos anteriores mostraram que este gene está envolvido na longevidade, na restrição calórica, alta osmolaridade e nas percentagens de NAD^+/NADH [22, 23]. Mas a função principal deste gene é a transformação da nicotinamida em ácido nicotínico em situações de stress [2]. Contudo, continuam-se a desenvolver estudos de modo a verificar qual o papel mais exacto que desempenha o gene PNC1 na célula.

Por fim, na nutrigenómica, o metaboloma num dado fluido corporal é influenciado por factores endógenos, como idade, sexo, composição do organismo e genética, bem como patologias subjacentes. A maioria da microflora é também um factor significativo de potencial confusão nos perfis metabólicos e pode ser classificado quer como endógeno ou factor exógeno. Os principais factores exógenos são a dieta e as drogas.

Um exemplo é a investigação feita pela Nestlé, onde investigam a ligação entre o fenótipo metabólico e a vontade em comer chocolate. Os resultados dos estudos mostram que os metabolitos dos indivíduos do “desejo de chocolate” comparados com aqueles que se apresentam como “chocolate indiferente” são bastante diferentes. Os cientistas da Nestlé também concluíram que as actividades metabólicas de uma pessoa saudável poderão ser moduladas pela dieta mais do que se pensava anteriormente. A impressão metabólica encontrada fornece uma evidência de uma relação específica entre preferências alimentares e fenótipos metabólicos [24].

A metabolómica oferece a oportunidade de um perfil metabólico único, que reflecte o equilíbrio de todos os factores do metabolismo individual [10], cuja utilidade poderá ir para além da nutrigenómica, como no acompanhamento dos testes médicos feitos ao longo dos treinos dos atletas de alta competição, com maior rigor científico para defesa do próprio atleta e do médico que o acompanha.

Ferramentas da metabonómica

Num estudo metabonómico, as técnicas mais usadas para análise das amostras são duas: a ressonância magnética nuclear, NMR, e a espectrometria de massa, MS. Estas duas técnicas são as mais usadas na detecção e análise de metabolitos celulares, embora diferentes, por vezes complementam-se.

A espectrometria de massa apresenta várias vantagens: entre elas estão principalmente a sua alta sensibilidade. Esta técnica combina a possibilidade de detectar pequenas quantidades de compostos conhecidos em amostras biológicas complexas. Além disso, a combinação da espectrometria de massa com outras técnicas de separação (cromatografia e electroforese) tornou esta técnica numa “arma” poderosa na identificação e análise química de amostras biológicas complexas.

Por sua vez, as razões para a utilização da ressonância magnética nuclear no estudo do metaboloma fundamentam-se no facto de esta técnica representar uma ferramenta poderosa devido à informação estrutural que nos fornece acerca da presença de pequenas moléculas orgânicas, e ainda a existência de um grande número de metabolitos catalogado em base de dados. Para além destas vantagens, existem também outras bastante importantes, a preparação das amostras é muito simples [10] e de fácil quantificação. Neste caso, torna-se mais rápido a quantificação via NMR do que MS, uma vez que nesta última é necessário adicionar padrões internos. A ressonância magnética nuclear quando comparada com a espectrometria de massa apresenta-se como uma técnica não invasiva permitindo guardar as amostras para estudos futuros. Apresenta ainda uma menor sensibilidade, revelando algumas desvantagens, pois para além de serem necessárias maiores quantidades de amostra, torna-se menos sensível na detecção de determinados metabolitos.

A técnica NMR prova ser uma tecnologia poderosa na investigação de biofluidos, capaz de produzir perfis compreensivos sem se recorrer a uma pré-selecção de parâmetros analíticos ou mesmo à derivatização das amostras [10, 25]. Esta técnica também apresenta uma característica bastante importante para o nosso estudo: reprodutibilidade. Ou seja, obtêm-se sensivelmente os mesmos espectros, após a aplicação dos mesmos procedimentos e nas mesmas condições de estudo [26].

Em contrapartida, em certas circunstâncias, os espectros ^1H poderão não nos fornecer informações suficientes na caracterização completa de um metabolito, principalmente quando o composto é deficiente em prótons ou quando os prótons são permutáveis com o solvente. Por outro lado, a ressonância magnética nuclear do ^{13}C é pouco sensível e a análise de uma única amostra poderá levar horas. Adicionalmente, o custo e manutenção dos equipamentos de NMR são mais elevados que os correspondentes equipamentos MS.

Devido à complexidade dos espectros obtidos por ressonância magnética nuclear, como também por espectrometria de massa, utiliza-se um conjunto de ferramentas matemáticas e estatísticas, a quimiometria, figura 2. Este estudo tem como objectivo responder a determinadas questões que se colocam quando ocorre uma alteração fisiológica nas células, tais como: o metabolismo foi alterado, como e porquê?

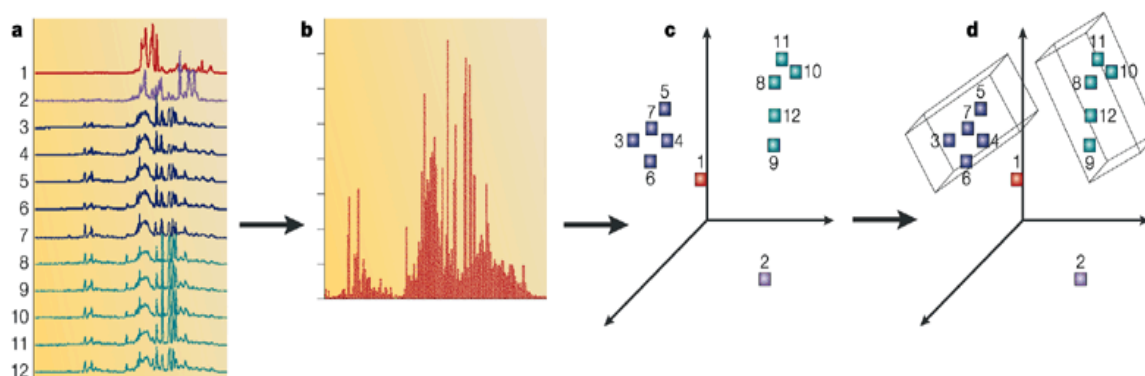


Figura 2 – Quimiometria na metabolómica / metabonómica

a) Os vários espectros de NMR 1D, b) Redução dos primeiros dados; c) Mapeamento de dados não supervisionados a 3 dimensões, e d) Classificação supervisionada e calculado o limite de confiança.

Resumindo, para um estudo metabonómico por ressonância magnética nuclear necessita-se de duas fases fundamentais. Numa primeira fase, ao fim de se obter as amostras, adquirem-

se todos os espectros através da técnica de NMR, de forma a obter uma impressão digital (*fingerprint*) das amostras, e realiza-se posteriormente um estudo quimiométrico (exemplos: PCA, PLS e PLS-DA). Numa segunda fase, através dos resultados obtidos do estudo quimiométrico, identificam-se os biomarcadores que respondem às questões anteriores e correlacionam com as mudanças fisiológicas da célula.

O Fenómeno da Ressonância Magnética Nuclear

As exigências da química e da bioquímica em especial promoveram uma espantosa evolução tanto no plano tecnológico como no plano teórico no domínio da ressonância magnética nuclear. Um dos saltos importantes deu-se nos anos 70 com a introdução da técnica de impulso r.f., em conjunto com técnicas de análise matemática, baseadas em transformações de Fourier, com ajuda preciosa da tecnologia computacional. Desta forma, deixou-se de recorrer a uma variação contínua da frequência da radiação, reduzindo os tempos de aquisição dos espectros. Consequentemente, e sendo a técnica de NMR pouco sensível, permitiu estudar amostras muito mais diluídas e a utilização de outros núcleos como sondas magnéticas em NMR (incluindo núcleos em abundância natural muito pequena) [27].

O estudo metabonómico por espectroscopia de ^1H NMR evoluiu desde logo a partir da investigação de composições de biofluidos que remonta à década de 80. Desde o início dessa investigação, um largo número de aplicações em metabonómica foram surgindo. Desta forma, a espectroscopia de ^1H NMR, em particular a urina, foi o começo da investigação em metabonómica [25].

Fundamentos do NMR

Núcleos com *spins* diferentes de zero podem considerar-se como pequenas barras magnéticas, que por acção de um intenso campo magnético externo, podem alinhar-se ou opôr-se em relação a ele, ou seja, desdobram-se em vários níveis de energia inicialmente degenerados. O desdobramento em vários níveis de energia depende do valor do *spin* nuclear do núcleo. Por exemplo, no caso do *spin* nuclear ser igual a $\frac{1}{2}$ ocorre o desdobramento em dois níveis de energia também inicialmente degenerados. Quando estes núcleos são submetidos à radiação electromagnética na região radiofrequências, pode ocorrer uma transição do nível de energia de *spin* nuclear mais baixo para um nível de energia mais alto, absorção, figura 3 [28].

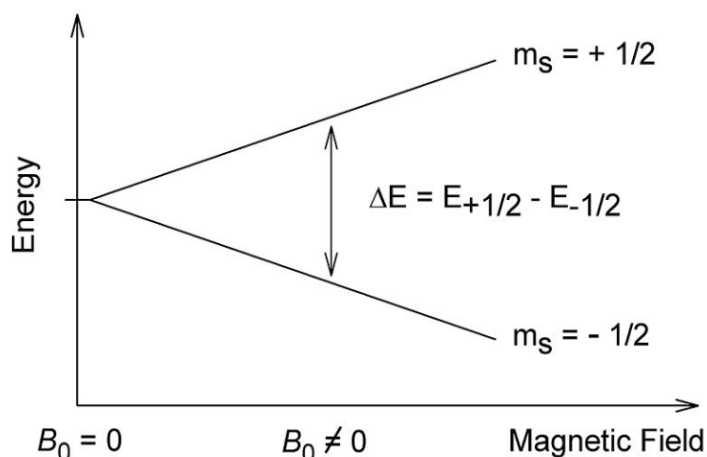


Figura 3 – Energia do *spin* nuclear para um núcleo com $I = 1/2$ em função de um campo magnético B_0

Uma experiência de ressonância magnética nuclear consiste em submeter determinados núcleos atômicos, com número de *spin* diferente de zero, à acção de um campo magnético intenso. Quando a energia da radiação electromagnética, emitida por emissores de radiofrequência, promove transições entre os níveis energéticos, estas podem ser detectadas através da captação da radiação emitida (no domínio das radiofrequências) quando os núcleos excitados regressam ao seu estado de equilíbrio (níveis de energia mais baixos) [29].

A determinação precisa dos valores das frequências emitidas (desvio químico, ppm), os valores das constantes de acoplamento e a multiplicidade dos sinais, constituem a essência de informação necessária para obter a estrutura molecular da amostra [27]. O desvio químico depende da vizinhança química de cada núcleo e da sua nuvem electrónica, logo, dos núcleos contidos na amostra em estudo. A constante de acoplamento é uma constante que não depende do campo aplicado, mas sim da estrutura em que os núcleos estão integrados, incluindo os electrões das ligações entre os núcleos vizinhos, bem como a orientação dessas mesmas ligações. O sinal de NMR de um dado protão acoplado a protões equivalentes é um multiplete de diversas linhas, ou seja, corresponde à multiplicidade do sinal de um determinado núcleo acoplado com outros núcleos equivalentes [29].

O requisito fundamental para a realização de ressonância magnética nuclear de alta resolução é o intenso campo magnético estático. Este campo magnético é criado através de magnetes solenoides supercondutores. O solenoide funciona imerso num banho de hélio líquido (4 K, para se tornar supercondutor), cercado por um escudo de blindagem de

campo arrefecido por um banho de azoto líquido, a 77 K, que por sua vez está rodeado por uma câmara sobre vácuo.

Esta estrutura constitui um sistema extremamente eficiente e uma vez activado, o magnete pode operar durante muitos anos sem qualquer fonte de energia externa. O *dewar* do magnete é atravessado por um tubo central oco que se encontra à temperatura ambiente, onde está situada uma série de bobines eléctricas, conhecidas por bobines *shim*. Estas geram os seus próprios pequenos campos magnéticos e são utilizadas para otimizar a homogeneidade do campo central estático, permitindo remover heterogeneidades residuais num processo conhecido como *shimming*. Este processo é necessário para cada amostra a analisar. Exactamente no centro do campo magnético rodeado pelas bobines de *shim*, fica colocada a cabeça da sonda [27].

Como descrito anteriormente, a técnica de ressonância magnética nuclear fundamenta-se na absorção selectiva de ondas de rádio por amostras, colocadas num campo magnético forte. Quando amostra é irradiada com um impulso intenso de energia radiofrequência, todos os núcleos dos compostos presentes na amostra irão absorver simultaneamente energia nas diversas frequências individuais. A interacção de todas as frequências resulta num interferograma em função do tempo (FID) que é convertido por transformada de Fourier num espectro de absorção em função da frequência.

A sensibilidade é dos factores mais importantes em qualquer experiência de ressonância magnética nuclear e depende da intensidade do campo magnético. Com isso, torna-se importante utilizar um volume correcto de amostra de acordo com a combinação tubo/sonda utilizados de modo a evitar diluir excessivamente a amostra. Alguns factores podem interferir com a sensibilidade, tais como: a temperatura, a presença de iões paramagnéticos, viscosidade do solvente e vários factores instrumentais.

Diferenças no processo de aquisição dos espectros 1D e 2D

Muita informação se pode obter através da ressonância magnética nuclear. Normalmente, nos estudos metabolómicos utilizam-se os espectros de uma dimensão (1D) de forma a minimizar o tempo de aquisição. Contudo, esta vantagem poderá por vezes não compensar, e tornar-se bastante difícil identificar os metabolitos num congestionamento espectral [30].

De forma a resolver a complexidade dos espectros e de maneira a minimizar a dificuldade de identificar os metabolitos adquirem-se espectros de duas dimensões (2D). Existem algumas diferenças no tempo de aquisição como nos programas de pulsos utilizados para 1D e 2D.

As experiências unidimensionais têm uma estrutura comum, representada na figura 4, um período de preparação, no qual o sistema de *spins* é preparado num determinado estado, através dum intervalo que lhe permite atingir o estado de equilíbrio térmico, seguido de um ou mais impulsos; e o período de detecção, t_1 , durante o qual o sinal é medido.

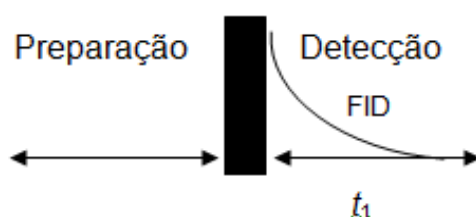


Figura 4 – Sequência no tempo numa experiência de impulsos 1D.

Uma experiência básica 1D consiste numa sequência de pulso muito simples.

Na figura 5 apresenta-se o esquema temporal de uma experiência bidimensional. O tempo de evolução é um tempo variável. O aumento do tempo de evolução conduz à obtenção de dados 2D, a partir de uma sequência contínua de experiências 1D. Tal como a figura ilustra, aumentando o período de evolução t_1 numa quantidade constante Δt_1 , ao longo de n experiências com a mesma sequência de impulsos, o sinal detectado fica dependente de t_1 e de t_2 : $S(t_1, t_2)$. O sinal pode sofrer duas transformações de Fourier, a respeito de t_2 e de t_1 , obtendo-se duas variáveis de frequência [27].

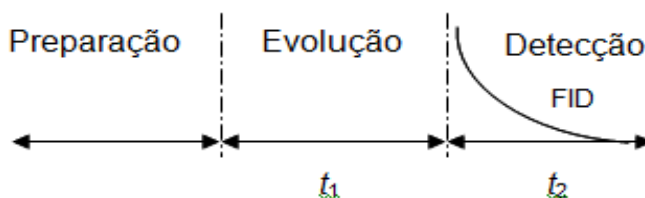


Figura 5 – Sequência no tempo numa experiência de impulsos 2D.

Uma experiência básica 2D consiste numa sequência de pulso ligeiramente mais complexa que a 1D.

Através da descrição feita para as duas experiências, 1D e 2D, é fundamental realçar que para além da informação que os espectros 2D nos fornecem, as correlações entre núcleos (homo ou heteronucleares), e sendo o 2D a acumulação de vários espectros 1D, o tempo de aquisição dos espectros 2D é superior comparado com os espectros 1D.

Espectrómetros de ressonância magnética nuclear

O CERMAX - Centro de Ressonância Magnética António Xavier, situa-se fisicamente no ITQB – Instituto de Tecnologia Química e Biológica, e é um dos centros da Rede Nacional de Ressonância Magnética que tem por missão principal facultar à comunidade científica portuguesa as melhores condições possíveis para a utilização da técnica de Ressonância Magnética Nuclear.

Este centro possui o espectrómetro de mais alto campo em Portugal, um Avance III de 800 MHz (Bruker BioSpin, Rheinstetten, Germany) equipado com as valências de espectroscopia de líquidos e sólidos e é particularmente adequada para estudos estruturais de moléculas de pequena ou média dimensão, e especialmente para a determinação de estruturas de proteínas em solução.

Também fazendo parte da rede nacional de Ressonância Magnética, o Departamento de Química em Aveiro, possui um espectrómetro Avance DRX de 500 MHz (Bruker BioSpin, Rheinstetten, Germany) equipado com as valências de espectroscopia de líquidos e sólidos e a possibilidade de acoplamento LC-NMR.

A diferença destes dois espectrómetros reside na intensidade do campo magnético. Assim, o aumento do campo magnético permite aumentar consideravelmente a separação entre os dois níveis de energia e, conseqüentemente, permite aumentar a intensidade dos sinais e uma maior separação dos mesmos [28], obtendo assim uma maior resolução no espectrómetro de 800 MHz. Esta característica, o aumento do campo magnético, foi por nós utilizada de forma a facilitar a identificação dos metabolitos presentes nas amostras complexas a analisar.

Contudo, em estudos anteriores [31] em urina humana analisaram o efeito do campo magnético na aquisição de espectros para o estudo metabonómico. Através desses estudos concluíram que existem diferenças visíveis, a nível de informação espectral, do

espectrómetro 250 até ao 500 MHz enquanto que do 500 para o 800 MHz, essa diferença de informação não é visível. Neste trabalho adquiriram-se os espectros 1D no espectrómetro 500 MHz, pois não são esperadas diferenças significativas em relação ao 800 MHz no resultado da análise estatística. Adquiriram-se os 2D no espectrómetro 800 MHz, de forma a obter uma maior resolução na separação dos núcleos para a identificação dos metabolitos.

Evolução dos Métodos na Preparação das Amostras

Por vezes existe uma confusão entre a palavra obtenção e preparação das amostras. Apesar de estas duas palavras apresentarem um significado muito semelhante, em determinadas situações, diferem bastante. Assim, neste trabalho, entende-se por obtenção todo o processo/método realizado até se obter uma preparação passível para ser analisada por uma técnica espectroscópica. Isto inclui o crescimento celular e a extracção dos metabolitos. Enquanto a preparação implica todo o procedimento utilizado com vista análise pela técnica seleccionada.

Análise metabólica e a metabonomica são os termos largamente utilizados para análise de um grande número de metabolitos de um organismo ou célula. Para que seja possível analisar esses metabolitos torna-se bastante importante desenvolver métodos sensíveis, exactos e reprodutíveis para a obtenção das amostras, ou seja, a extracção dos metabolitos [32].

De uma forma geral, dependendo da natureza das amostras, o procedimento de obtenção é bastante simples para qualquer técnica de análise. Contudo, nos casos em que se pretende estudar extractos de células, a obtenção poderá ser bastante complexa, mas no final a preparação das mesmas para análise por NMR torna-se muito simples.

Existem amostras que não necessitam de muitos cuidados para as obter, como por exemplo: a urina, o sangue, o plasma e o líquido amniótico [3, 5, 33]. Nestes casos, as amostras ao fim de serem colhidas são congeladas, podendo ser centrifugadas, e posteriormente preparadas de uma forma muito simples para análise por NMR. Neste caso, a preparação passa apenas pela adição de uma solução tampão contendo D₂O, ou então unicamente D₂O e uma referência, caso seja utilizada, e por fim, o acerto do pH caso seja também necessário. Quando se estudam extractos celulares, a obtenção das amostras não se torna tão simples como as anteriores, o procedimento torna-se mais complexo e os cuidados devem ser maiores até à aquisição dos espectros.

O procedimento para a obtenção dos extractos deverá preencher determinados requisitos: (obter) um rendimento elevado, reprodutibilidade, facilidade no método e tornar-se num procedimento rápido. Estas quatro características são bastante importantes para o nosso estudo.

Porem, a validação de um método de extracção, para estudos metabonómicos poderá passar por várias fases. Neste estudo analisaram-se diferentes métodos com o intuito de diminuir a variabilidade entre amostras, mas de uma forma geral existem sempre variações nos resultados. Existem dois tipos de variabilidade: técnica, criada pelo procedimento experimental, incluindo o procedimento para a obtenção da amostra e análise instrumental; e a inerente variabilidade biológica [34]. Para que seja possível analisar e identificar as diferenças metabolómicas deve-se ter em atenção que a variabilidade técnica deverá ser muito menor que a biológica.

Passos na extracção dos metabolitos

É fácil estabelecer um método de extracção eficiente para metabolitos específicos ou classes de metabolitos. Contudo, com uma grande variedade de metabolitos contidos dentro de uma célula ou organismo, todos com diferentes propriedades químicas e físicas, é difícil extrair em simultâneo todas as classes com elevada eficiência. Torna-se importante encontrar um método eficiente que de uma certa forma resolva esse problema, e proporcione um perfil metabólico global. Utilizando os diferentes métodos na extracção das distintas classes de metabolitos não se obtém perfis metabolómicos globais e de uma certa maneira, diferentes métodos de extracção não são equivalentes no perfil metabolómico.

Mas antes de passar à fase de extracção deve-se ter em atenção também os crescimentos celulares. A ressonância magnética nuclear apresenta-se como uma técnica pouco sensível. De forma a contornar essa característica foi necessário crescer um número suficiente de células para permitir a análise dos extractos. Para além do número de células deve-se também ter cuidados: na esterilização; saber como e quais os cuidados a ter no crescimento das células; onde e ao fim de quanto tempo se devem colher as células; a técnica a utilizar na extracção dos metabolitos; e por fim, como preparar as mesmas para aquisição dos espectros.

Para o desenvolvimento deste trabalho, foi necessário estudar os parâmetros de crescimentos das leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, pois na ausência dessa informação não seria possível otimizar todo um procedimento experimental.

Para a extracção dos metabolitos, existem variadíssimos métodos que poderão ser usados nas células. Mas de uma forma geral existem sempre três passos fundamentais para a obtenção dos extractos.

Como o metabolismo reflecte a última resposta do sistema biológico às mudanças genéticas ou ambientais, uma paragem rápida, *quenching* do metabolismo da célula e da actividade enzimática deverá ser o primeiro passo a tratar [35]. Caso contrário, obter um método, no qual a actividade enzimática não é controlada, poderá causar alterações no perfil metabólico. Existem diversas maneiras para a paragem rápida do metabolismo, e é usual utilizar mudanças rápidas na temperatura ou no pH. Um dos métodos mais usados no *quenching* é a rápida adição de uma solução fria de metanol [36]. Contudo, com este método de *quenching* dá-se a desorganização das paredes celulares das leveduras e, consequentemente, perda dos metabolitos para o meio [35].

O segundo passo a realizar deverá ser a extracção dos metabolitos intracelulares. Existem diferentes procedimentos para a extracção das diferentes classes de metabolitos, mas nenhum é 100% eficaz na extracção. Métodos ácidos e alcalinos são muito comuns na extracção de compostos estáveis em meio ácido ou básico. Por exemplo, o método ácido é usado na extracção de nucleótidos e de metabolitos solúveis em água [37]. Contudo, para um estudo metabonómico é evidente que nem todos os metabolitos são estáveis a determinados pH's, e consequentemente poderão ocorrer a destruição dos mesmos.

Por fim, também importante e muito comum, necessita-se de concentrar amostra. Torna-se muito frequente a utilização de dois métodos neste passo: a liofilização e a evaporação. A liofilização é comum na remoção de água das amostras, de forma a concentrar e evitar a degradação térmica. Em alternativo, para extractos não aquosos, poder-se-á utilizar a evaporação dos solventes.

Leveduras *Saccharomyces cerevisiae*

Como descrito anteriormente, deve-se ter em atenção à natureza das amostras e à forma como se obtêm para posteriormente serem analisadas. Neste estudo foi fundamental analisar as células *Saccharomyces cerevisiae*, as suas características, como crescem e o que acontece nas várias fases de crescimento. Na ausência desta informação podem-se obter perfis metabolómico incorrectos, pois uma das características ao longo das fases de crescimento é a variação do metabolismo.

Assim, para começar, as leveduras, figura 6, como os bolores e cogumelos, pertencem ao reino dos fungos. Apresentam-se caracteristicamente sob forma unicelular.

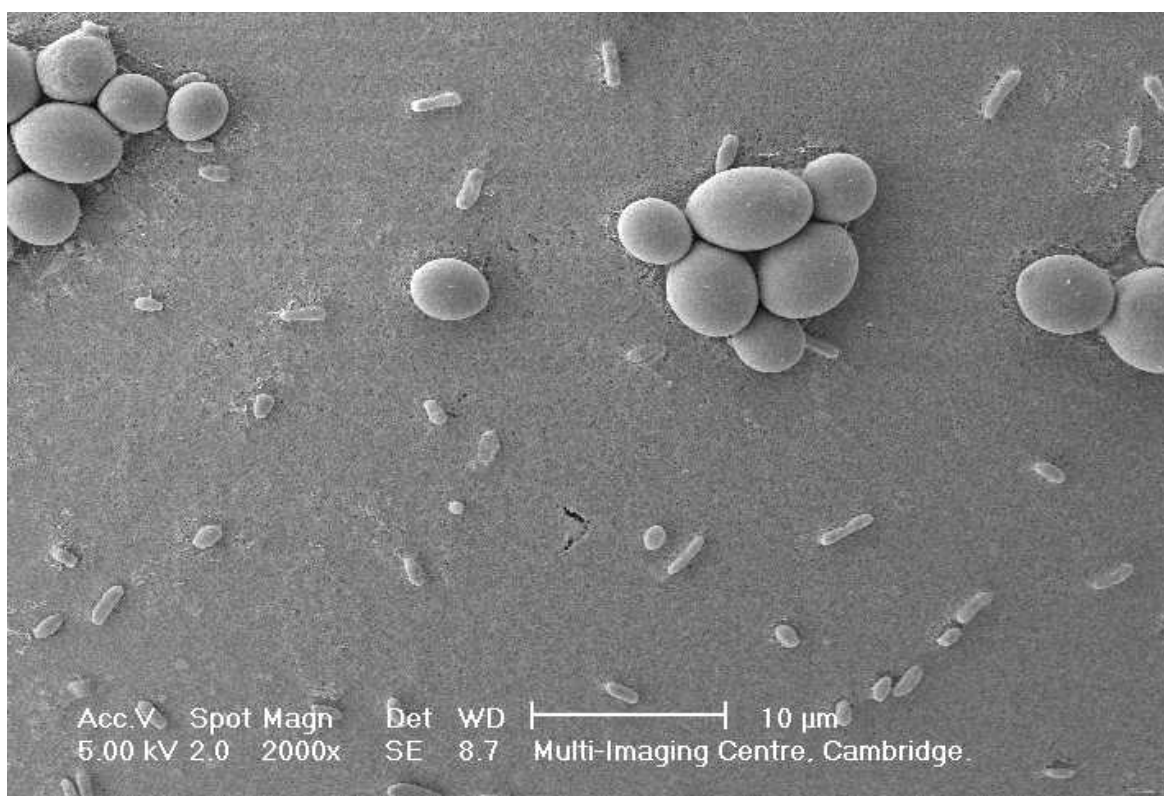


Figura 6 – Imagem de SEM das leveduras *Saccharomyces cerevisiae*. [38]

A etimologia da palavra levedura tem origem no termo latino *levare* com o sentido de crescer ou fazer crescer, pois as primeiras leveduras descobertas estavam associadas a processos fermentativos como o de pães e de mostos que provocam um aumento da massa do pão ou do volume do mosto pela liberação de gás e formação de espuma nos mostos.

As leveduras têm sido intensivamente estudadas, tanto na biologia celular e molecular, como modelos eucarióticos, e comparadas com a *Escherichia coli* como modelo procariótico. As *Saccharomyces cerevisiae* têm aproximadamente 5 a 10 µm de diâmetro e produzem-se por um processo de divisão designado por *budding*. Este processo de divisão é muito comum nas plantas e nos fungos, mais conhecido por gemulação, consistindo na reprodução assexuada em que a nova célula se forma como uma protuberância da célula-mãe. Uma das características principais nesta reprodução é o facto de os novos organismos serem geneticamente idênticos aos “progenitores” que lhes deram origem [39].

Durante décadas as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* foram os primeiros organismos mais bem caracterizados sob o ponto de vista genómico e fisiológico [18]. Muitas proteínas importantes na biologia humana foram descobertas em estudos homólogos em leveduras, onde incluem proteínas do ciclo celular, e processos enzimáticos. Esta característica torna-se um factor bastante importante, pois de uma maneira geral será possível interligar as mudanças fisiológicas observadas nas leveduras, quando induzidas com os erros de descodificação do mRNA, com o metabolismo das células humanas.

Este estudo poderá abrir novos caminhos na compreensão das doenças auto imunes e mesmo neurodegenerativas. Já existem vários estudos feitos e que comprovam que existe agregação de proteínas em doenças neurodegenerativas [40]. Ou seja, estudando o perfil metabólico das células com erros de descodificação do mRNA em células eucarióticas e sabendo que uma das consequências é a agregação de proteínas, poder-se-á ter uma noção, a nível metabólico, do que se passa nas células quando existe uma doença neurodegenerativa e relacioná-las com outras patologias humanas.

Acompanhamento do crescimento de uma população de leveduras

Para os crescimentos das células da população da levedura *Saccharomyces cerevisiae* teve-se em atenção às curvas de crescimento e ao seu comportamento em meio líquido.

O crescimento das leveduras divide-se em diversas fases de crescimento que se distinguem de formas diferentes, figura 7. A figura seguinte relaciona o número de células com as várias fases de crescimento microbiano ao longo do tempo.

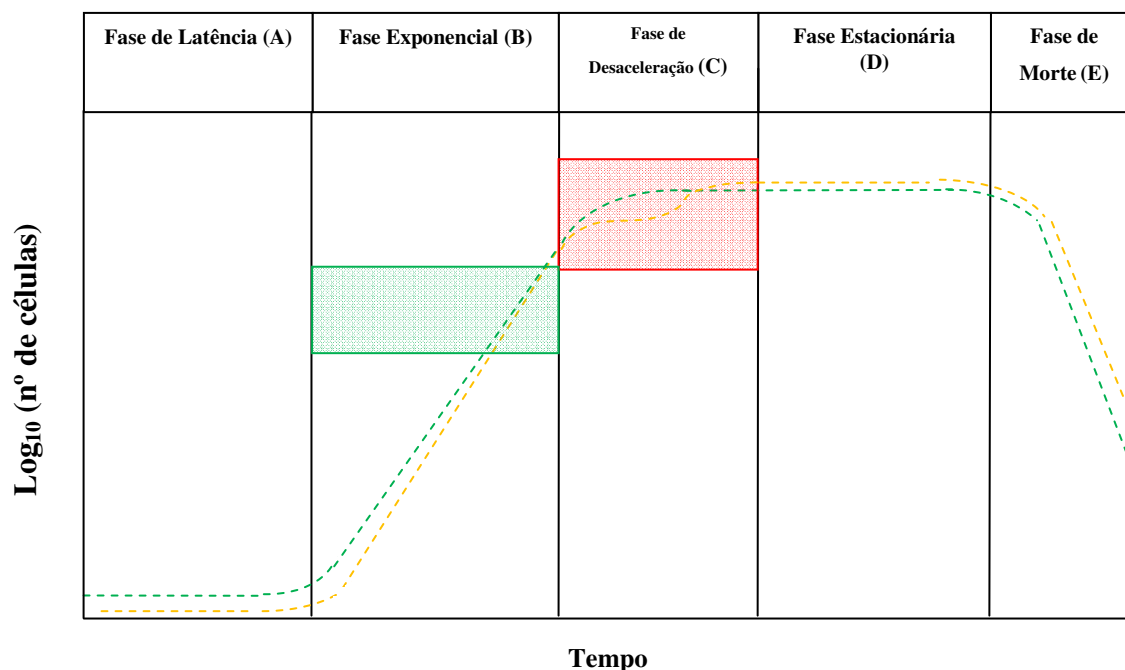


Figura 7 – Fases do crescimento microbiano.

Fases do crescimento microbiano, onde se relaciona o número de células com as várias fases de crescimento ao longo do tempo. A linha verde corresponde ao que seria expectável num crescimento microbiano “ideal”, enquanto que a linha amarela corresponde ao crescimento típico para as leveduras *Saccharomyces cerevisiae*. A área a verde apresentada na fase exponencial representa a zona onde se devem recolher as células para estudo dessa mesma fase. A área a vermelho na fase de desaceleração representa a zona “Diauxic Shift”.

Durante o período de tempo que se segue à inoculação do meio de cultura, as células têm normalmente que se adaptar ao novo meio. Durante este período inicial, pode não ocorrer multiplicação celular, pelo menos em condições de equilíbrio, e verifica-se ainda a síntese de novas enzimas. Estas podem ser necessárias à síntese de compostos essenciais ao crescimento, que não se encontram presentes no meio de cultura, ou para a hidrólise/metabolização dos compostos presentes a que as células não estão adaptadas. Esta fase dita de latência, figura 7 (A), pode ter uma duração mais ou menos extensa consoante o estado fisiológico da cultura usada como inóculo e as condições de crescimento. Por exemplo, a presença de uma percentagem elevada de células não viáveis no inóculo, um meio de cultura contendo um nutriente essencial difícil de metabolizar, ou a incubação em condições ambientais de stress a que o organismo não se encontra adaptado, conduzem normalmente a fases de latência extensas [41].

Após um curto período de aceleração, a taxa de crescimento da população torna-se constante, isto é, as células sofrem divisão e o seu número duplica após um determinado

intervalo de tempo. Durante esta fase, fase exponencial, figura 7 **(B)**, as células dividem-se e a população cresce com uma taxa específica de crescimento. Esta etapa depende do potencial genético do microrganismo, da composição do meio de cultura e das condições de crescimento (temperatura, pH, disponibilidade de água, etc.) [41].

Após esta fase, ocorre um declínio da taxa específica de crescimento, fase de desaceleração, figura 7 **(C)**, em resultado da diminuição para valores limitantes do crescimento da concentração de um (ou mais) nutrientes essenciais ao metabolismo celular e/ou do aumento da concentração de produtos do metabolismo tóxicos para as células.

Na fase estacionária, figura 7 **(D)** o esgotamento de um nutriente essencial e/ou a acumulação de produtos inibidores do metabolismo leva a que o crescimento da população pare. No entanto, em carência de nutrientes, as células podem manter-se viáveis durante períodos de tempo mais ou menos longos, à custa das reservas endógenas, que usam em processos de manutenção. Contudo, mais cedo ou mais tarde, verifica-se um declínio da concentração de células viáveis durante a fase de morte celular, figura 7 **(E)**.

Durante a fase de morte ocorre a perda irreversível da capacidade de divisão celular (morte celular). Tal origina um decréscimo da concentração de células viáveis na população microbiana ao longo do tempo [41].

Embora, em teoria, o crescimento de uma população seja equilibrado e exponencial, na realidade tal não acontece. Na figura 7, a curva verde representa o que seria expectável num crescimento microbiano “ideal”, enquanto a curva amarela se aproxima da realidade da curva de crescimento típica para estas leveduras. A diferença entre as duas curvas de crescimento reside na zona de desaceleração na qual as leveduras deixam de fermentar e passam a respirar. Esta alteração de um processo anaeróbio para aeróbio acontece devido à quantidade de nutrientes presentes no meio. As leveduras, na presença de muitos alimentos preferem efectuar a fermentação em detrimento da respiração. Esta mudança é completamente instável a nível metabólico e consequentemente o metabolismo altera-se completamente. Esta zona, denominada por “*Diauxic Shift*” [42], indicada a vermelho na figura 7, será bastante importante para o nosso estudo na zona exponencial, pois indicarmos-á a zona onde recolher as células para a extracção dos metabolitos.

A descrição e caracterização, ao longo do tempo, do ciclo de vida das leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, através das curvas de crescimento, são fundamentais para o

nosso estudo. Com isso, teremos noção do que se passa ao longo do crescimento, as mudanças metabólicas, e também, não menos importante, estaremos em condições de recolher as células com sensivelmente a mesma OD e na mesma zona da curva de crescimento para obter sempre, para todas as amostras, um perfil metabólico idêntico entre elas. Esta característica é muito importante, pois se forem comparados perfis metabólicos das células transformadas com os vários plasmídeos estudados nas várias fases de crescimento, será necessário recolher todas as células na mesma zona da curva de maneira que seja possível compará-las entre si.

Como será descrito posteriormente com maior pormenor, durante o crescimento das leveduras, na zona “*Diauxic Shift*”, o pH irá baixar até estabilizar a um valor mais ácido. O tempo desde o início até ao começo do decréscimo do pH foi um indicador fundamental para a recolha das células na fase exponencial. Em contrapartida, para a fase estacionária as células foram recolhidas quando o pH estabilizou e quando a OD apresentou o maior valor possível.

Mistranslation – Erros de Tradução

Este trabalho tem como objectivo encontrar um procedimento que possibilite o estudo de perfis metabólicos, mais especificamente estudar perfis metabólicos de células com erros de tradução. Mas porquê estes erros e como é que criamos um modelo que induza erros ao nível da tradução?

A fidelidade de descodificação do mRNA é garantida por um número relativamente elevado de factores da síntese proteica, nomeadamente, factores de alongamento da tradução do mRNA, proteínas ribossomais, aminoacil-tRNA sintetases, enzimas do metabolismo de nucleótidos modificados e de maturação dos tRNAs, rRNA e mRNAs [43]. A expressão destes genes é alterada em situações de stress, envelhecimento e em certas patologias, levantando a hipótese de que o erro de descodificação do mRNA - para além de mediar alterações do código genético – tem um papel importante na degeneração e evolução celular [44].

A tradução do mRNA é um processo preciso, mas não é livre de um processo biológico sem erros. A perda da fidelidade da tradução do mRNA resulta na síntese de proteínas aberrantes em grande escala e em recentes estudos, indica que erros de tradução promovem a agregação de proteínas, apoptose, doenças neurodegenerativas e a formação de tumores [1, 2, 45].

Todas as alterações que ocorrem no código genético reflectem-se na síntese proteica e consequentemente nas vias metabólicas [46]. Para estudar estes perfis metabólicos serão utilizadas as leveduras *S. cerevisiae* como modelo, de forma a entender o que acontece à resposta celular face aos erros de tradução do mRNA. Mas para isso é necessário criar condições que possibilitem esse estudo.

Processo de inserção do tRNA mutante

Na figura 8 encontra-se esquematizado o modelo que explica a forma como é introduzido o tRNA mutante, encontrado na *Candida albicans*, nas células. As células contêm toda a informação, que provem do núcleo, de forma a traduzir o codão CUG em leucina, enquanto que os plasmídeos, situado no citoplasma, expressam tRNAs mutantes. Estes

tRNAs mutantes, devido à sua estrutura, irão traduzir e introduzir um aminoácido diferente para a mesma sequência do codão CUG, a serina.

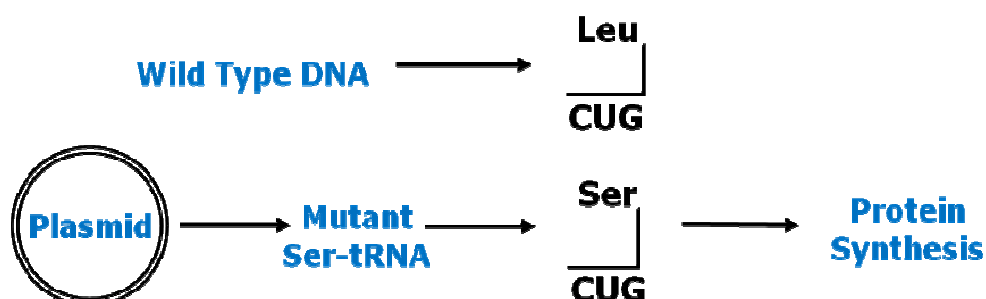


Figura 8 – Método utilizado na criação dos erros de tradução.

O DNA das células expressa tRNA que codificam o codão CUG em leucina, os plasmídeos situados no citoplasma expressam tRNA mutantes que traduzem o mesmo codão em serina. Nesta situação para o mesmo codão existirão dois aminoácidos diferentes.

No citoplasma, estes dois tRNAs irão participar/competir durante a síntese proteica, onde irão introduzir os diferentes aminoácidos, a leucina e serina, em diferentes percentagens ao longo das novas cadeias peptídicas. Consequentemente, na mesma sequência de mRNA iremos ter aminoácidos diferentes na decodificação da mesma, produzindo assim proteínas mutantes.

Neste estudo foram utilizados três plasmídeos diferentes. O plasmídeo G₃₃ (pUKC702; Santos MAS, 1999), figura 9, provoca erros na tradução do codão CUG na levedura.

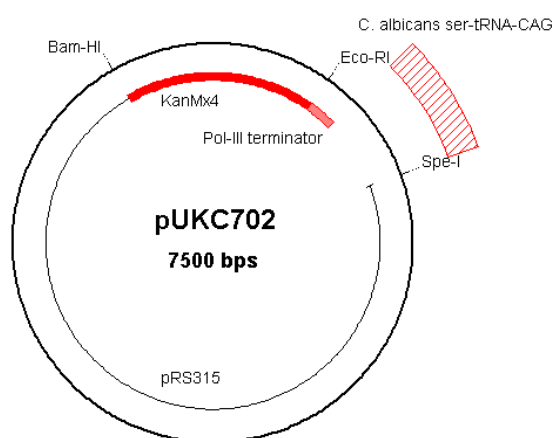


Figura 9 – Plasmídeo G₃₃ (pUKC702; Santos MAS, 1999).

Este plasmídeo ao ser transformado em leveduras faz com que o gene do tRNA-CAG de serina (baseado no gene de um tRNA existente em *Candida albicans*) seja expresso nestas células. Este tRNA, que pode ser correctamente processado e aminoacilado nesta levedura, vai competir com o tRNA de leucina, já existente em *Saccharomyces cerevisiae*, pela descodificação do codão CUG. Ou seja, durante a competição pela descodificação do codão CUG, os dois tRNAs, um de serina e outro de leucina, vão fazer com que em todas as proteínas produzidas por tradução de mRNAs que contenham codões CUG, venham a conter leucinas ou serinas nas posições correspondentes a esses codões [47].

Outro plasmídeo utilizado foi o T₃₃, – pUA69 – que é exactamente igual ao plasmídeo G₃₃, excepto na posição 33 do gene do tRNA, que em vez de apresentar uma guanina, tem uma uridina. Esta diferença, na posição 33 do tRNA, figura 10, faz com que os níveis de erros na tradução do codão CUG com o plasmídeo T₃₃ sejam maiores e mais eficientes do que com o plasmídeo G₃₃, ou seja, faz com que exista percentagens diferentes a nível da inserção da serina, figura 11. Assim, para o plasmídeo G₃₃ temos uma percentagem de 1.4% de inserção da serina, enquanto para o plasmídeo T₃₃ tem 2.31% de inserção [47].

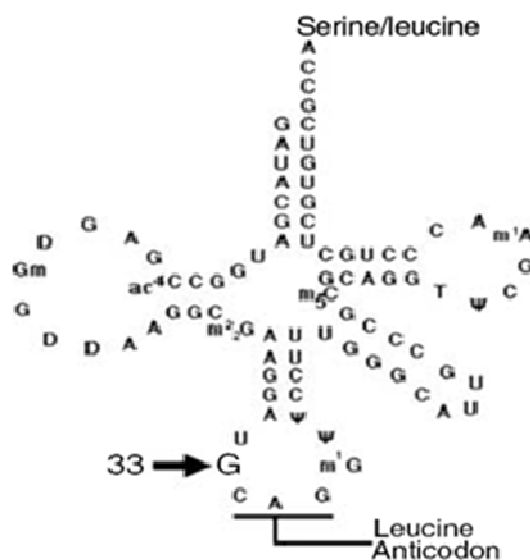


Figura 10 – Leucine anticodon, tRNA_{CAG}^{Ser}

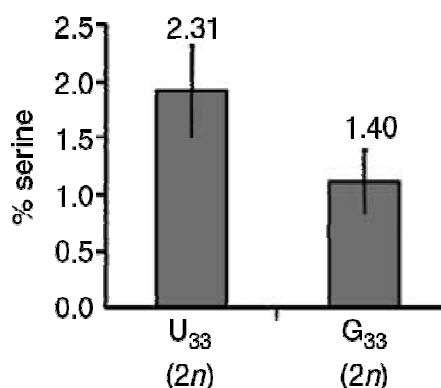


Figura 11 – Percentagens de incorporação da serina e leucina para a posição CUG

Devido à diferença de composição na posição 33 do tRNA, ocorrerão percentagens diferentes de inserções aleatórias. Neste caso, as células T₃₃ apresentam maior percentagem e, consequentemente, apresentam maiores erros. [47]

Foi também utilizado o plasmídeo Controlo, figura 12, que não apresenta nenhuma sequência de DNA da *Candida albicans* para expressar os respectivos tRNA mutantes nas células *S. cerevisiae*.

Este plasmídeo para além de nos servir para controlo, pois não irá fazer com que haja nenhum erro de descodificação do mRNA, também será importante para a composição do meio que utilizamos nos crescimentos. Visto que o plasmídeo Controlo apresenta uma zona de resistência ao antibiótico poderemos utilizar a mesma composição do meio com o antibiótico, geneticina. Caso contrário, se houver alguma diferença na composição do meio de crescimento todo o estudo de perfil metabólico poderá ficar comprometido como será visto mais à frente na discussão.

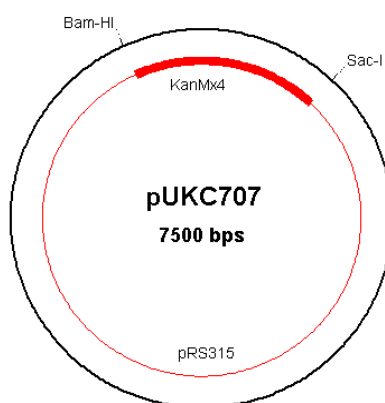


Figura 12 – Plasmídeo Controlo (pUKC707; Santos MAS, 1999).

Estudo Quimiométrico

Tipicamente, um estudo metabonómico por NMR pode gerar centenas de amostras de biofluido e, conseqüentemente, centenas de espectros de NMR bastantes complexos. Até para um espectroscopista muito experiente, a análise individual de cada um desses espectros é um trabalho demasiado exaustivo. Mas a quantidade de espectros não se torna o mais importante, mas sim a complexidade dos espectros obtidos das amostras. Se por vezes um composto se torna muito complicado ao ser analisado num espectro, então um espectro com centenas de compostos ainda se torna muito mais complicado e complexo. Desta forma, foram adaptadas e/ou desenvolvidas ferramentas adequadas à análise de espectros complexos de uma forma rápida e eficiente. Surgem assim as ferramentas matemáticas e estatísticas, a quimiometria.

Em estudos metabonómicos existem e são usadas duas classes de técnicas denominadas por não supervisionadas e supervisionadas [10]. Métodos supervisionados utilizam dados multi-paramétricos que podem ser modelados para que a classe de uma determinada amostra independente possa ser prevista com base numa série de modelos matemáticos, derivados do conjunto original de dados ou de um grupo de dados teste. Estes métodos usam a informação da classe de forma a maximizar a separação entre classes de dados [32]. São exemplos a modelação suave e independente da classificação analógica (SIMCA), método dos mínimos quadrados parciais (PLS) e análise discriminante PLS (PLS-DA), podendo ser utilizados para determinar, ou prever, objectos desconhecidos para o sistema. Estes baseiam-se nas propriedades espectrais da ressonância magnética nuclear, consistindo em técnicas válidas para a produção de modelos que visam a previsão de alterações que possam ocorrer em determinados organismos ou células [19].

Em métodos como o PCA (Análise de Componentes Principais) denominados por técnicas não supervisionadas (determina a organização dos dados) não existe necessidade de conhecimento prévio da classe de amostras e baseando-se apenas no cálculo de variáveis latentes. A aplicação do PCA permite uma melhor representação, em termos de variação bioquímica, de um dado conjunto de dados para ser apresentada em duas ou três dimensões [8].

PCA – Análise de Componentes Principais

A análise por PCA apresenta-se como uma ferramenta adaptada à metabonomica a tal ponto que, os gráficos onde a mesma é apresentada e utilizada são essenciais numa publicação ou apresentação sobre metabonomica [8, 13]. A quantidade de dados espectrais gerados por NMR pode ser encarada como um problema estatístico de multi variáveis. As verdadeiras variáveis são as concentrações dos metabolitos. Na prática, as pseudo variáveis são criadas através da integração dos dados espectrais, em regiões discretas da largura dos picos espectrais, associados aos metabolitos. A área integrada para cada curva dessas regiões discretas (denominadas por *buckets*) é calculada, e esses valores passam a ser as variáveis [8]. A larga região dos 0.05 ppm é a típica largura dos buckets que, por sua vez, gerará 200 a 250 buckets de dados para um espectro de NMR típico com uma largura espectral de 10 ppm. Certas regiões do espectro, como as que contém as ressonâncias para a água ou a ureia (para a urina), são tipicamente excluídas deste processo de formação de buckets. No caso de espectros de NMR de biofluidos, é de esperar que essas sub-variáveis estejam fortemente correlacionadas entre si e que as moléculas possam apresentar mais do que um pico espectral, contribuindo assim para mais do que um bucket ou variável. A análise de componentes principais (PCA) é um método estatístico que reduz um elevado número de variáveis (geralmente, correlacionadas entre si) a um número menor de variáveis não correlacionadas, que são denominadas por componentes principais, PC.

O primeiro componente principal explica a maior variabilidade dos dados, o segundo componente é independente do primeiro (é ortogonal) e explica em segundo lugar a maior variabilidade dos dados, e assim sucessivamente. O objectivo desta relação é a redução dimensional enquanto se sacrifica o mínimo da certeza das medidas.

Resumindo, o PCA é a decomposição de dados não tratados em *scores* que indicam a relação entre amostras e *loadings* que, por sua vez, indicam as correlações entre as variáveis. Ou seja, é um processo que permite projectar o espaço original de variáveis num espaço de dimensão mais reduzida.

Capítulo II.

Metodologia

Este trabalho focou-se na optimização de um procedimento experimental para que futuramente seja possível estudar e identificar as diferenças metabólicas que ocorrem nas células *Saccharomyces cerevisiae* quando ocorrem erros na descodificação do mRNA na síntese proteica, ou seja, obter e estudar diferentes perfis metabólicos.

Para este estudo, foi necessário estudar algumas características das leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, os métodos mais eficientes para a extracção dos metabolitos de forma a obter a maior quantidade de amostras, e todas as variáveis experimentais que pudessem intervir. Estes estudos tiveram a finalidade de obter um método que envolvesse a extracção total de todas as classes de metabolitos de forma a obter reprodutibilidade e baixa variabilidade entre células contendo o mesmo plasmídeos.

Em seguida, encontram-se descritos os vários procedimentos efectuados ao longo deste estudo, tais como: a composição dos meios de crescimento e o respectivo crescimento das células transformadas; e os métodos utilizados na extracção dos metabolitos. Também se encontra descrito o processo relativo às curvas de crescimento das células com os respectivos plasmídeos, a identificação dos metabolitos, a descrição dos parâmetros para a aquisição dos espectros de NMR e por fim, análise quimiométrica.

Os extractos metabólicos obtidos para a análise por NMR foram preparados em quatro fases distintas: os crescimentos das células em placas, os pré-inóculos, os inóculos e por fim, utilizando um método de extracção mais adequado, a extracção dos metabolitos, figura 13. Ao longo destas fases existem determinados factores que devem ser controlados, e são esses os factores que se pretenderam estudar neste trabalho.

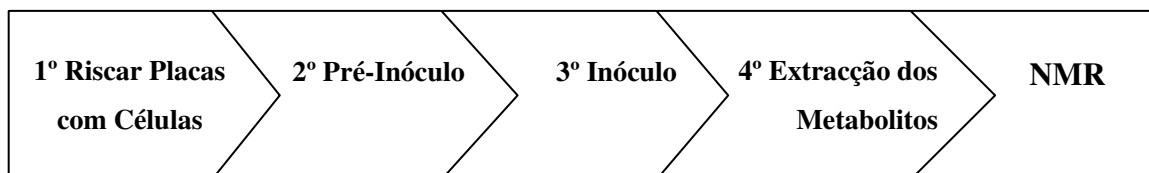


Figura 13 – Procedimento de análise metabonómica por ressonância magnética nuclear.

Transformação de Alta Eficiência em *Saccharomyces cerevisiae*

A transformação das células *S. cerevisiae* (estirpe CEN.PK2 a/ α), células mutantes com o respectivo plasmídeo, Controlo, T₃₃ e G₃₃; já se encontram transformadas sendo somente necessário crescer os pré-inóculos e, posteriormente os respectivos inóculos [43, 45, 47]. As células transformadas com os respectivos plasmídeos a estudar encontram-se todas congeladas a -80° C e serão, posteriormente, riscadas nas caixas de Petri com o respectivo meio, agar e antibiótico.

Meios de Cultura

As células com os respectivos plasmídeos cresceram em meios ricos, YPD [39], constituído por: 1,0% de extractos de leveduras (Formedium), 2,0% de peptona (Formedium) e 2,0% de glucose (Formedium).

Outro meio utilizado para este estudo foi o meio mínimo, SD [39], constituído por: 2% de glucose (Formedium) e 2% de “Yeast Nitrogen Base” (Formedium). São ainda adicionados 10 ml de uracilo (200 mg/L) (Formedium), 2 ml de triptofano (200 mg/L) (Formedium) e 2 ml de histidina (200 mg/L) (Formedium), para um total de 1000 ml.

Em todas as soluções de meio adicionou-se um antibiótico 200 mg/L, geneticina (Formedium), de forma a seleccionar somente as células que contivessem o respectivo plasmídeo.

Processo de crescimento celular

De modo a eliminar qualquer contaminação durante o crescimento celular, todo o material utilizado para o estudo (soluções, material de vidro e pontas) foi autoclavado e o trabalho na bancada foi sempre à chama do bico de Bunsen.

Tanto na primeira como na segunda parte do trabalho, para o mesmo meio de crescimento, riscou-se cada placa de Petri com as células contendo cada plasmídeo, previamente misturada com Agar (Formedium) e geneticina (Formedium). Seguidamente deixaram-se as placas na incubadora durante alguns dias a 30° C. Tanto para as células Controlo como

para as células G₃₃, foram necessárias 48 horas, enquanto para as células T₃₃ foi necessário mais tempo, sensivelmente entre 72 a 96 horas.

Optimização do Procedimento Experimental – Métodos de Extracção – Primeira Parte

Em estudos anteriormente realizados no Laboratório de Biologia de RNA do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro, todos os crescimentos foram feitos com volumes de meio muito baixos, mas em contrapartida obtinham sempre OD bastantes elevadas. No nosso caso, devido às células apresentarem uma baixa taxa de crescimento e à baixa sensibilidade da técnica de NMR, houve necessidade de crescer células suficientes de forma a obter quantidades finais de massa suficiente para análise.

Assim, para todas as células com os plasmídeos, prepararam-se pré-inóculos de 100 ml e meios de inóculos de 500 ml, os últimos sendo subdivididos em duas fracções idênticas de 250 ml, figura 14.

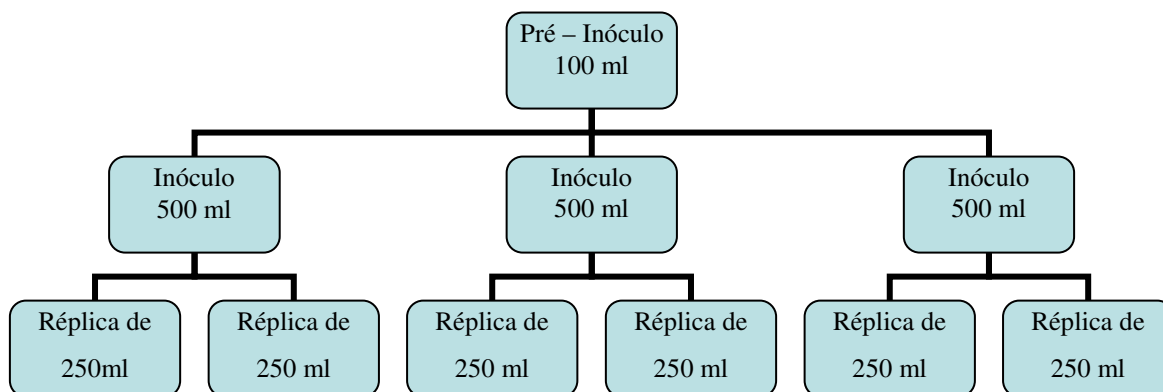


Figura 14 – Esquema inicial utilizado na preparação dos meios para os crescimentos das células com os respectivos plasmídeos.

Os tempos de crescimento dos pré-inóculos e dos inóculos, nas incubadoras a 30°C e a uma rotação de 180 rpm, diferem para cada cultura de células (Controlo, G₃₃, T₃₃) e também da OD_{600nm} (Densidade Óptica, medida a um comprimento de onda de 600 nm) com que se

iniciam os crescimentos. De forma a entender como variavam os crescimentos com as ODs, realizaram-se alguns testes com valores iniciais diferentes, 0.1 e 0.05.

Medidas as ODs dos pré-inóculos transferiram-se os volumes necessários para que os inóculos começassem os crescimentos com uma OD de 0.1. Posteriormente os inóculos foram colocados na incubadora a uma temperatura de 30° C, com uma rotação de 180 rpm. Medindo as ODs dos meios, deixaram-se que estas atingissem a fase estacionária com uma OD compreendida entre 2 e 2.5, para posteriormente as células serem recolhidas.

Já com as células crescidas procedeu-se à extracção dos metabolitos. Através destes primeiros crescimentos e da análise multivariada, foram testados alguns métodos de extracção e também algumas variáveis experimentais. Os procedimentos realizados encontram-se descritos em seguida.

Como descrito anteriormente, foram testados alguns métodos, nomeadamente o método esferas de vidro [48], método da liofilização [49], e o método da liofilização com esferas de vidro a seco. Estes três métodos estão dispostos pela ordem como foram testados, e em seguida está representada uma tabela com as médias de pó, extractos liofilizados, obtidas no final de cada método, tabela 1. No capítulo três, discussão e resultados, serão discutidos com mais pormenores os métodos, os resultados obtidos e as diferenças entre eles.

Tabela 1 – Médias das massas obtidas nos três métodos utilizados para a extracção dos metabolitos.

Método de Extracção dos Metabolitos Utilizado	Método Esferas de Vidro (Bundy, et al., 2008)	Método de Liofilização (Lewis, et al., 2007)	Método de Liofilização com Esferas de Vidro a Seco
Média das Massas Obtida (mg)	*	40.78	70.30

* Neste método não obtivemos pó e massa suficiente, pois o resultado final era um gel.

Nestes três processos de extracção, as células foram recolhidas dos meios através da utilização da centrífuga a 2500 g e a uma temperatura de 8° C. Obteve-se o pellet, e procedeu-se à lavagem do mesmo com solução tampão fosfato 10 mM e pH 7,0 a 4° C, repetindo a lavagem 10 vezes, e congelou-se a -80° C. Em cada lavagem efectuada o

volume utilizado foi de 5 ml. Seguidamente, ao fim de dois dias a -80°C , prosseguiu-se com uma das técnicas de extracção abaixo descrita.

Método das Esferas de Vidro

Adicionaram-se cerca de 5 ml de solução de etanol (Panreac, 99.5%) (previamente aquecida a 80°C) a 75% (v/v) ao pellet lavado, e cerca de 3 ml de esferas de vidro (0.5 mm de diâmetro). No passo seguinte, a mistura foi vortexada durante três segundos, aquecida cerca de três minutos a 80°C e novamente vortexada durante trinta segundos. Este processo foi repetido e deixou-se a mistura a repousar cerca de 2 minutos a 80°C . Em seguida, decantou-se o sobrenadante para um novo tubo, as esferas de vidro foram lavadas com mais solução de etanol a 75% (v/v) e vortexadas durante trinta segundos. Juntou-se o lavado ao previamente decantado. Procedeu-se à centrifugação desse conjunto a 12000 g durante dez minutos. Adicionaram-se 15ml de água ultra pura e filtrou-se em centricons de 5 kDa (Amicon® Ultra 10MWCO, MILLIPORE) a uma rotação de 2500 g a 8°C . Por fim, todas as amostras foram rapidamente congeladas com azoto líquido e colocadas no liofilizador durante 48 horas.

Método de Liofilização

Após as várias lavagens do pellet de células obtido com a solução tampão fosfato, como descrito anteriormente, retirou-se o sobrenadante e congelou-se o pellet de células a -80°C . Ao fim de dois dias a -80°C , foram congeladas rapidamente em azoto líquido. As amostras posteriormente foram colocadas no liofilizador durante 48 horas.

Finalizada a liofilização, adicionaram-se 15 ml de água ultra pura aquecida às amostras em pó. O conjunto foi aquecido durante 20 minutos a cerca de 90°C .

As amostras arrefecidas foram filtradas em centricons de 5 kDa (Amicon® Ultra 5.0MWCO, MILLIPORE) a uma rotação de 2500 g a 8°C . Os filtrados, 10 ml, foram novamente liofilizados (segunda liofilização) durante 72 horas. A figura 15 ilustra o procedimento descrito.

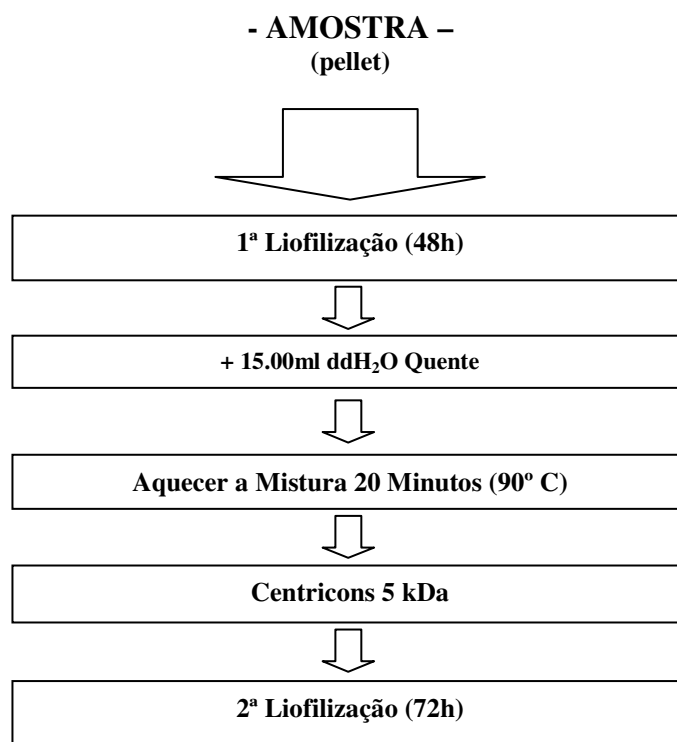


Figura 15 – Procedimento do Método de Liofilização.

Método da Liofilização com Esferas de Vidro a Seco

Tal como nas técnicas anteriores, e após as várias lavagens do pellet de células com a solução tampão fosfato, congelaram-se as amostras em azoto líquido que foram liofilizadas durante 30 horas.

Após a liofilização, adicionou-se um volume de esferas de vidro (0,5 mm de diâmetro) equivalente ao do liofilizado que foi em seguida colocado em gelo. Em seguida, para cada amostra durante 20 minutos, realizaram-se vários ciclos de vortex de um minuto, alternando com um minuto de repouso no gelo.

Adicionaram-se 10 ml de água ultra pura, seguindo de filtração em centricons de 5 kDa (Vivaspin 15 R 5.0 MWCO, Sartorius Stedim) a uma rotação de 2500 g a 8° C.

Devido à elevada concentração de metabolitos na fase estacionária, foi necessário repartir o filtrado em duas fracções idênticas e diluída ao mesmo volume de 10 ml com água ultra pura.

Posteriormente, todas as amostras foram rapidamente congeladas em azoto líquido e colocadas no liofilizador durante 48 horas. O diagrama da figura 16 ilustra a técnica descrita.

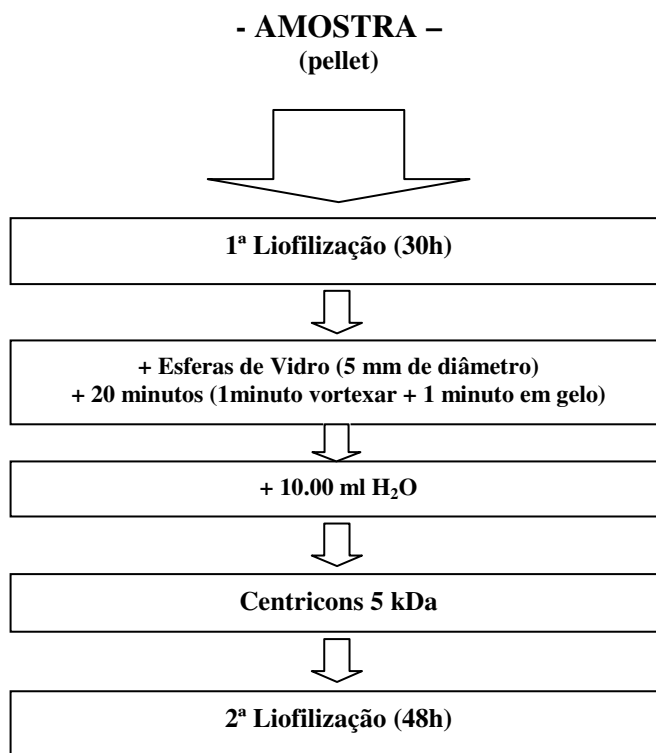


Figura 16 – Procedimento do Método Seco com Esferas de Vidro.

Optimização do Procedimento Experimental – Segunda Parte

Ao fim da análise de algumas variáveis (a composição dos meios e como é que os pré-inóculos e os inóculos influenciam os crescimentos), foi necessário estudar os crescimentos das células transformadas (Controlo, G₃₃ e T₃₃). Obtidas as curvas de crescimento, e em conjunto com os espectros obtidos por NMR, obteve-se um perfil metabólico para cada crescimento de células com os respectivos plasmídeos e o conhecimento necessário, do que acontece ao longo das curvas e onde recolher as células para a extracção dos metabolitos.

Como descrito anteriormente, em primeiro lugar riscaram-se as placas de Petri com as células transformadas, de forma a obter o número de células necessárias para preparar o pré-inóculo.

Utilizaram-se 205 ml de meio tanto para os pré-inóculos como para os respectivos inóculos, conforme apresentado na figura 17.

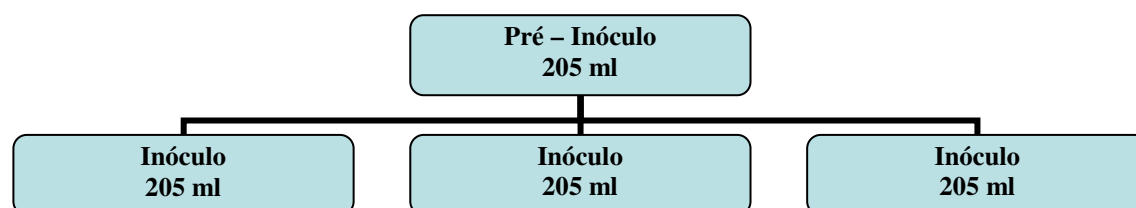


Figura 17 – Esquema final utilizado na preparação dos meios para os crescimentos das células com os respectivos plasmídeos.

Através dos resultados obtidos na primeira fase de estudo, confirmou-se a reprodutibilidade dos resultados. Através disso, não se necessitou mais de réplicas e não foram necessários 500 ml de meio, para que depois fossem divididos em duas fracções iguais, mas apenas 205 ml.

Curvas de Crescimento

De forma a obter um perfil metabólico, realizaram-se curvas de crescimento das células transformadas. Para tal, retiraram-se dez volumes iguais dos respectivos pré-inóculos, para

que os inóculos começassem todos com uma OD de 0.1. Posteriormente foram transferidos para 10 erlenmeyers, contendo já os meios autoclavados e a genéticina, e posteriormente colocados na incubadora a uma temperatura de 30° C e a uma rotação de 180 rpm.

As ODs foram medidas ao longo do tempo de crescimento de células para cada plasmídeo. Para cada grupo de células Controlo e G₃₃, as ODs foram medidas de 2 em 2 horas num espaço de 27 a 29 horas. Quanto às células T₃₃, as ODs foram medidas de 4 em 4 horas durante 40 horas.

Crescimentos das células

Após o estudo feito do perfil metabólico ao longo das curvas de crescimento das células transformadas, procedeu-se aos crescimentos das mesmas de forma que fossem recolhidas em tempo iguais e com ODs semelhantes.

Uma vez mais, os pré-inóculos foram preparados para todos os estudos conforme descrito na secção 2.2.

Para o estudo na fase exponencial de crescimento, ao fim de 6 horas, tanto as células Controlo como as G₃₃ foram recolhidas dos inóculos. Em contrapartida, as células T₃₃ necessitam de mais de 6 horas para atingir a fase exponencial onde se recolhem as células, sendo esse período de 13 horas.

Outro estudo feito foi na fase estacionária. Através da análise das curvas de crescimento, verificou-se também que o tempo necessário para os Controlo e G₃₃ foi de 20 horas, enquanto as células T₃₃ necessitam de 33 horas.

Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Neste estudo metabonómico foram obtidos os espectros em dois diferentes espectrómetros: 500 e 800 MHz, como descrito na figura 18.

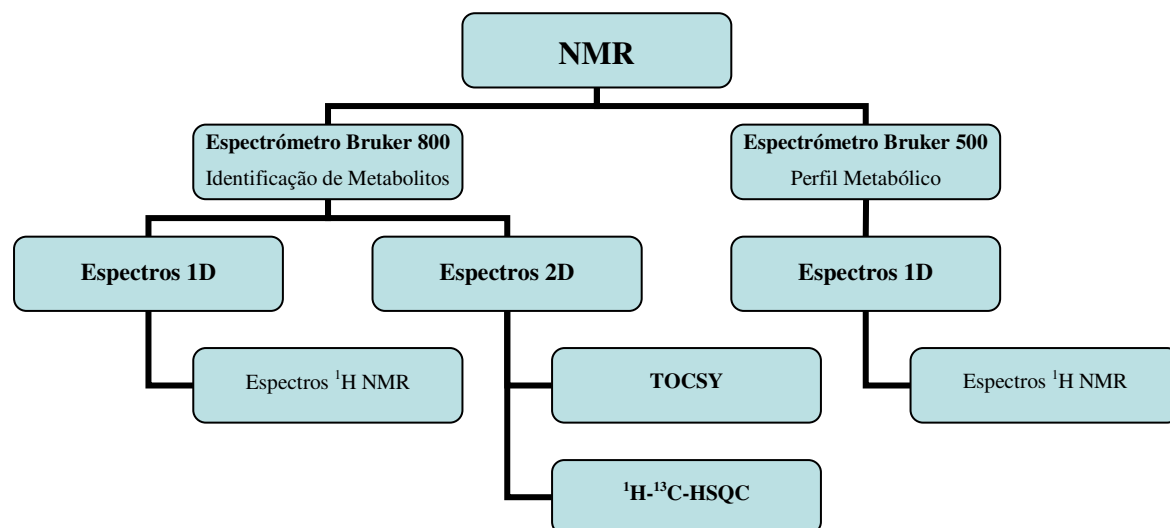


Figura 18 – Diagrama dos espectros adquiridos nos dois diferentes espectrómetros, 500 e 800 MHz.

Numa primeira fase, os espectros iniciais foram obtidos no Centro de Ressonância Magnética António Xavier – CERMAX, situado fisicamente no ITQB num espectrómetro de 800 MHz (Bruker BioSpin, Rheinstetten, Germany). Obtiveram-se espectros 1D e 2D, sendo estes utilizados para a identificação dos metabolitos.

Este centro apresenta um conjunto de sondas que permitem a aquisição de espectros de correlação multidimensional convencionais, tais como COSY, NOESY, TOCSY, HSQC, HMQC, HMBC ou combinações destes como sejam HSQC-TOCSY e HSQC-NOESY. Neste trabalho utilizou-se no espectrómetro de 800 MHz a sonda TXI-Z H-C/N/-D (5mm) com detecção inversa (otimizada para a observação de ¹H) construída exclusivamente para operar em 3 frequências fixas (¹H, ¹³C e ¹⁵N). Esta está equipada com gradientes de campo pulsado no eixo Z e sintonização automática de frequências. Permite ainda adquirir espectros de correlação multi-dimensionais de dupla ressonância em amostras de proteínas duplamente marcadas, bem como espectros de menor complexidade em amostras unicamente, ou não, marcadas. A sonda foi modificada pelo fabricante para responder a

amostras com elevada salinidade, como por exemplo os extractos intracelulares, estando particularmente adaptada para estudos estruturais de compostos de baixo peso molecular associados a análise metabolómica [50].

Na segunda parte do estudo, os espectros foram obtidos no Departamento de Química da Universidade de Aveiro, num espectrómetro de 500 MHz (Bruker Avance DRX 500) (Bruker BioSpin, Rheinstetten, Germany), onde se obtiveram espectros 1D com o intuito de estudar as variáveis existentes no processo.

Em Aveiro, para os espectros adquiridos no espectrómetro de 500 MHz, utilizou-se a sonda BBI-Z H-X-D (5 mm). Esta sonda tem a característica de apresentar uma detecção inversa (otimizada para a observação de ^1H) e a possibilidade de desacoplamento de diversos núcleos. Também se encontra equipada com gradientes de campo pulsado no eixo Z e com sintonia automática de frequências. Esta sonda pode ser usada para a realização de estudos estruturais que envolvam técnicas de correlação homonuclear (por exemplo, COSY, NOESY, TOCSY, etc.), heteronuclear (tais como HSQC, HMQC ou HMBC) ou combinações destas duas experiências. É, ainda, frequentemente usada para a aquisição de espectros de prótons que requeiram o desacoplamento de qualquer núcleo pertencente à banda larga de frequências ou experiências em que seja necessário proceder à supressão do sinal do solvente.

Preparação das Amostras para NMR

Na primeira parte deste trabalho, utilizando o método de liofilização, e finalizada a segunda liofilização, obtiveram-se massas diferentes para cada amostra. A todas as amostras adicionou-se uma solução tampão fosfato 0.1 M a pH 7.0 e TSP 1 mM contendo D₂O, de modo que as mesmas apresentassem igual concentração e volume mínimo de 600 µl. Verificou-se o pH, e acertou-se, caso necessário, com soluções de NaOD e DCl a pH 7.0. Ao acertar o pH das amostras, evitou-se a formação de precipitado vortexando logo em seguida. Existindo, ou não, formação de precipitado, centrifugaram-se os eppendorfs durante 2 minutos a 12000 g.

Com o apoio da micropipeta, colocaram-se as amostras nos tubos de NMR (ALDRICH ® 528-PP, 5 mm), para se obter os respectivos espectros.

Na segunda parte, após a segunda liofilização, foram também obtidas massas ligeiramente diferentes para cada amostra. Neste caso o procedimento foi alterado, em novos eppendorfs pesaram-se 20 mg de cada amostra e adicionaram-se 670 µl de solução tampão fosfato 0.1 M contendo D₂O a pH 8.0, de modo a que todas as amostras apresentassem a mesma concentração.

Verificou-se o pH e acertaram-se estas com soluções de NaOD e DCl a pH 7.0. Ao acertar o pH das amostras, evitou-se a formação de precipitado da mesma forma anteriormente descrita.

Com a micropipeta, transferiram-se 650 µl de cada amostra para os tubos de NMR (ALDRICH ® 528-PP, 5 mm), para se obter os respectivos espectros.

Parâmetros para a obtenção dos espectros: espectrómetro de 800 MHz

Os espectros foram obtidos a uma temperatura controlada de 298 K. Os espectros 1D ¹H obtidos no espectrómetro 800 MHz, operando a uma frequência de 800.33 MHz, foram adquiridos por uma sequência de pulsos “noesypr1d” (Bruker BioSpin, Rheinstetten, Germany), com um número de scans igual a 128, com um tempo de repetição de 3.0 segundos, um tamanho de FID a 131 k, correspondendo a um tempo de aquisição de 2.04 s.

A correcção de fase e da linha de base foi feita manualmente, sendo esta última ajustada a um polinómio de quinto grau.

Para os espectros TOCSY a sequência de pulsos utilizada foi “dipsi2esgpph” (Bruker BioSpin, Rheinstetten, Germany), com um número de scans igual a 32, tempo de relaxação entre scans de 1.7 segundos, um tempo *mixing* de 60 ms, com 4096 pontos de tamanho de FID e com 512 incrementos para definir a dimensão indirecta.

Os espectros HSQC foram adquiridos por uma sequência de pulsos “hsqcetgpsisp2” (Bruker BioSpin, Rheinstetten, Germany), com 64 scans, tempo de repetição de 1.5 segundos, 2048 pontos de tamanho do FID com 512 incrementos para definir a dimensão indirecta, usando uma janela espectral de 12820.513 e 33333.50 Hz para o ^1H e ^{13}C , respectivamente.

Tanto para o TOCSY como para o HSQC, a linha de base foi feita automaticamente em ambas as dimensões e a fase foi corrigida manualmente, também em ambas as dimensões.

Parâmetros para a obtenção dos espectros: espectrómetro de 500 MHz

Os espectros foram obtidos a uma temperatura controlada de 298 K. Os espectros 1D ^1H obtidos no espectrómetro 500 MHz, operando a uma frequência de 500.13 MHz, foram adquiridos por uma sequência de pulsos “noesypr1d” (Bruker BioSpin, Rheinstetten, Germany), com um número de scans igual a 256, um tamanho de FID a 131k, tempo de repetição de 3.0 segundos, com um tempo de aquisição de 1.6 segundos.

A correcção de fase e da linha de base foi feita manualmente, sendo esta última ajustada a um polinómio de quinto grau.

Análise Quimiométrica

Análise de Componentes Principais

O procedimento apresenta-se resumidamente em seguida na figura 19. Depois da acumulação e processamento dos espectros (primeira imagem da figura 19 A.), é realizada uma primeira redução através dos dados dos espectros a uma dimensão.

Após a remoção de sinais redundantes e aplicação da escala adequada, a análise dos dados primários é usada no mapeamento das amostras de acordo com a sua composição bioquímica, recorrendo a métodos como o PCA. Todas as amostras intrinsecamente similares em composição e estados patofisiológicos ocupam posições vizinhas no espaço paramétrico das componentes principais (PC).

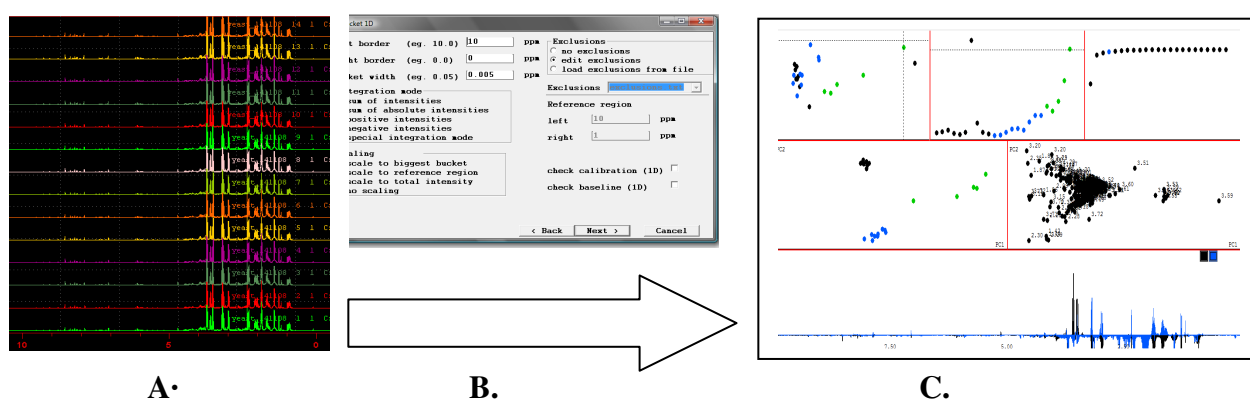


Figura 19 – Procedimento de análise de dados de NMR.

A) Espectros 1D processados. B) Definição do *Bucket Table*. C) Resultado da Análise PCA.

A análise de componentes principais, PCA, foi realizada no programa AMIX 3.8.4 (Bruker BioSpin, Rheinstetten, Germany), onde foram utilizados vários grupos de espectros de 1D ^1H NMR.

Inicialmente, tanto para análise por PCA como para a identificação, os espectros foram calibrados com base no pico do grupo metil da alanina: para o protão a 1.426 ppm, e para o carbono a 16.149 ppm.

Ao definir os *buckets*, figura 19 B., os dados das matrizes dos espectros usados encontram-se compreendidos entre 10.0 e 0.0 ppm, excluindo a região da água (4.5-5.1 ppm) e definindo a largura do *bucket* de 0.005 ppm.

Em seguida definiram-se os detalhes para calcular o PCA. Utilizaram-se as intensidades absolutas e um intervalo de confiança de 95%. Para a selecção dos componentes principais definiu-se o valor 3 de forma a obter as três principais componentes.

Identificação dos Metabolitos

Para a identificação dos metabolitos, recorreu-se ao software adequado para este estudo, tal como Topspin® 2.1 (Bruker BioSpin, Rheinstetten, Germany), AMIX 3.8.4 (Bruker BioSpin, Rheinstetten, Germany) e Sparky 3.113 [51].

Também foram usadas as bases de dados: Bruker BioSpin BBiorefcode 2.0.0 ® Base de Dados de Compostos Padrões (Bruker BioSpin, Rheinstetten, Germany) e *Biological Magnetic Resonance Data Bank* – BMRB [52].

Através do programa Amix foram utilizados dois métodos para a identificação dos metabolitos. O primeiro método foi a sobreposição dos sinais de compostos identificados em trabalhos anteriores [49], utilizando a base de dados da Bruker e os espectros 2D obtidos em Lisboa no ITQB. O segundo método utilizado foi com base na selecção da área de um sinal e, em seguida, numa procura de todos os sinais da base de dados da Bruker que pudessem pertencer, com uma determinada percentagem de confiança, à respectiva área seleccionada.

O programa Sparky apresenta-se como uma ferramenta útil na identificação dos compostos nos espectros de NMR, tornando a análise de 2D, ou mesmo de espectros com outras dimensões superiores, bastante mais simples. Neste trabalho utilizou-se este *software* para que a identificação de cada sinal, dos respectivos espectros, fosse o mais simples possível, devido à complexidade dos mesmos. Este *software* tem a particularidade de ser bastante simples de utilizar, processando directamente os sinais nos espectros provenientes do programa Topspin®, relacionando os espectros TOCSY e HSQC, e por fim, na identificação dos sinais, permitindo o armazenamento simples da informação obtida nos respectivos sinais [51].

Através destas ferramentas e das bases de dados foi possível identificar determinados metabolitos que se tornou bastante útil para a identificação dos *loadings* resultantes da análise por PCA, e para futuros estudos.

Capítulo III.

Resultados e Discussão

Neste capítulo serão apresentados os resultados e a respectiva discussão do trabalho efectuado. Um dos objectivos deste trabalho centrou-se fundamentalmente na obtenção de um procedimento optimizado e eficiente na extracção global dos metabolitos intracelulares, para que posteriormente fossem obtidos os perfis metabólicos das leveduras *S. cerevisiae* com erros de tradução do mRNA, por NMR.

Através da apresentação e discussão dos resultados, pretende-se entender, a nível experimental, o percurso efectuado e as alterações feitas ao longo do estudo para a obtenção de um método eficiente para a análise por NMR.

Inicialmente, como descrito na metodologia, cresceram-se as células *S. cerevisiae* da estirpe CEN.PK2 a/a com os respectivos plasmídeos: células Controlo, G₃₃ e T₃₃, até à fase estacionária. Após a sua recolha, foram sujeitas a técnicas de extracção de metabolitos, de forma a obter quantidades suficientes de extractos em pó, pois sendo o NMR pouco sensível, foram necessárias quantidades satisfatórias de amostra. Foi necessário também, diminuir a variabilidade entre amostras do mesmo plasmídeo de forma a obter reprodutibilidade no método, e encontrar um processo onde a extracção global de todos os metabolitos fosse eficiente.

Após a última liofilização, os extractos em pó foram reconstituídos com uma solução tampão fosfato contendo D₂O e acertados a pH de 7.0, para posteriormente se adquirirem espectros por NMR.

Obtidos os primeiros espectros, efectuou-se um estudo quimiométrico não supervisionado, PCA, e analisaram-se algumas variáveis experimentais (como por exemplo: a composição dos meios e as ODs). Com o intuito de recolher todas as células ao mesmo tempo, com sensivelmente a mesma OD e o mesmo número de células, de forma a diminuir a variabilidade entre células com o mesmo plasmídeo, estudaram-se as respectivas curvas de crescimento. Também foram estudados os métodos de extracção dos metabolitos e a sua influência na obtenção dos perfis metabólicos e, consequentemente, no estudo metabonómico. Este trabalho torna-se necessário para que no futuro seja possível estudar, comparar e identificar biomarcadores presentes quando ocorrem erros de decodificação do mRNA durante a síntese proteica no codão CUG.

Variáveis Experimentais - Meios e Culturas

Após alguns estudos preliminares efectuados, vários factores e parâmetros foram questionados e concluiu-se que não poderiam existir grandes diferenças tanto na composição dos meios de crescimento, bem como nos métodos a utilizar na preparação das amostras. Qualquer diferença que pudesse ocorrer durante o procedimento experimental, poderia alterar de algum modo os resultados, comprometendo todo o estudo metabonómico. Assim, inicialmente, obtidos os primeiros espectros efectuou-se a primeira análise por PCA.

Observando o primeiro gráfico de *scores* da análise por PCA das amostras Controlo e G₃₃ na fase estacionária, figura 20, confirmou-se que através da metodologia utilizada inicialmente, sem qualquer estudo prévio, surgia uma grande variabilidade entre amostras do mesmo plasmídeo e não existia uma separação nítida entre eles.

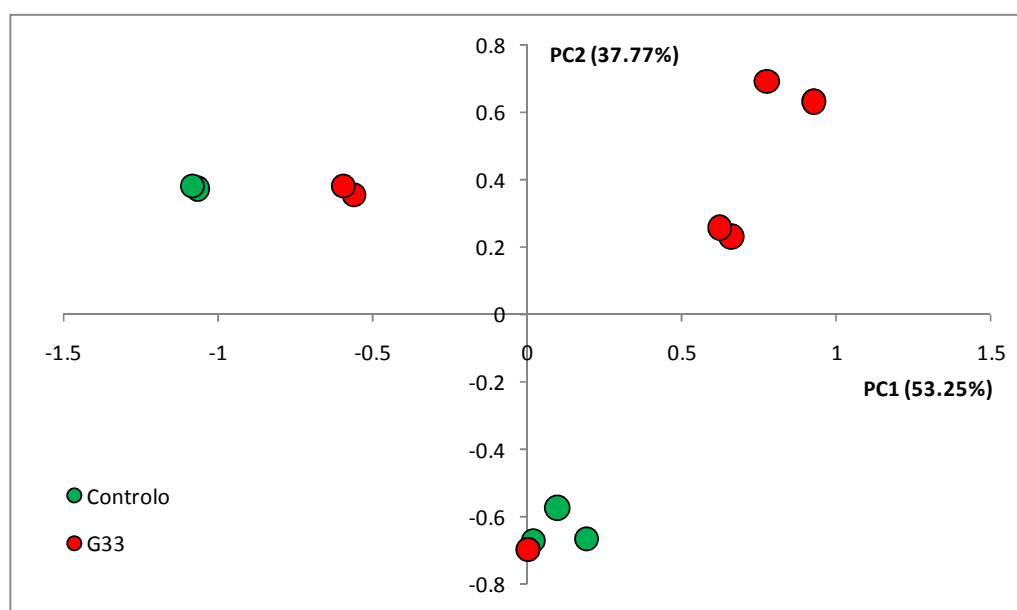


Figura 20 – Gráfico de Scores da Análise por PCA mostrando a variabilidade entre amostras.

As amostras a verde representam as células Controlo, enquanto que as de cor vermelha representam as células G₃₃. O gráfico não apresenta uma separação nítida entre células Controlo e G₃₃, verificando-se uma grande variabilidade entre as células com o mesmo plasmídeo.

De forma a minimizar essa variabilidade entre amostras, estudaram-se algumas variáveis experimentais e métodos de extracção, para que fosse possível controlar essas variações e

obter um perfil idêntico para cada grupo de células com o mesmo plasmídeo, para posteriormente se proceder às comparações entre eles.

Através de estudos anteriormente realizados, verificou-se que todas as células recolhidas das placas de Petri para os pré-inóculos deverão ser “frescas” [48]. Assim, todas as placas utilizadas para os crescimentos das células transformadas com os respectivos plasmídeos deverão ser novas, e não podem ser reutilizadas ou congeladas para uso futuro. Sempre que foram necessárias novas amostras, riscaram-se novas placas de forma a obter sempre células “frescas”, para adquirir novos espectros de NMR. Desta forma, evitou-se stress adicional, alteração da temperatura e, consequentemente, a obtenção de um perfil metabólico errado.

Outro parâmetro importante que se teve em conta, foi a recolha das células das placas para os pré-inóculos, figura 21.

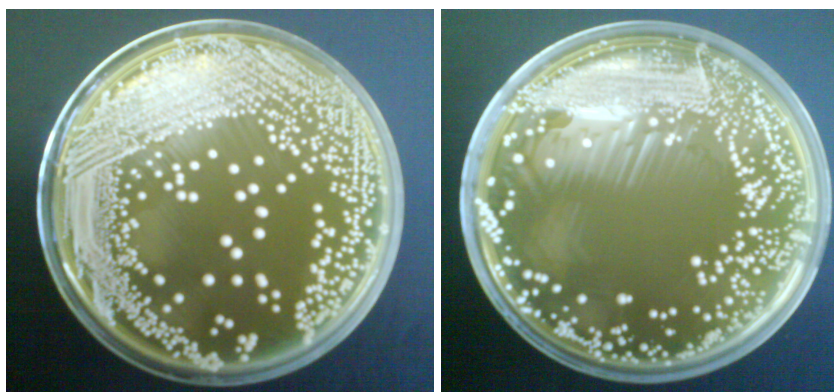


Figura 21 – Placas de Petri com os respectivos crescimentos das células com os diferentes plasmídeos.
A figura esquerda representa as células transformadas Controlo e do lado direito as células G₃₃.

Preferencialmente, as células da mesma colónia devem ser retiradas das placas de Petri, figura 22, não devendo ser misturadas colónias diferentes para o mesmo pré-inóculo. Ou seja, devem-se retirar as células da zona que foi riscada por último, pois essa área apresenta menor densidade celular e contem colónias isoladas. A explicação reside no facto de as células de colónias distintas poderem apresentar crescimentos diferentes e, automaticamente, obter perfis metabólicos distintos nas várias fases de crescimento. Com isso, tentou-se evitar retirar colónias distintas para o mesmo pré-inóculo. Este parâmetro

muitas vezes torna-se difícil de controlar devido ao pouco crescimento das células nas placas de Petri, como é o caso das células T₃₃.

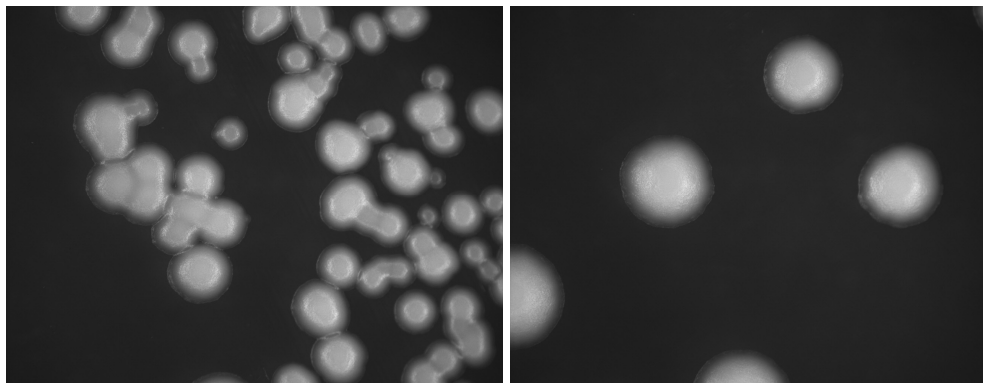


Figura 22 – Colónias de células do plasmídeo Controlo.

Nas placas de Petri, apresentam-se muitas vezes várias zonas com colónias de células. Do lado direito, observa-se um aglomerado de colónias onde não se deve retirar as células para os pré-inóculos. No lado direito, visualizam-se colónias separadas onde poder-se-ão retirar as células para os pré-inóculos.

Uma vez que foram necessárias novas placas de Petri, com células novas para o pré-inóculo, também se prepararam novas amostras para a obtenção dos espectros por NMR. Para confirmar esta afirmação, efectuou-se o estudo de armazenamento das amostras. Usaram-se duas amostras em pó, Controlo e G₃₃, já anteriormente utilizadas na obtenção de espectros (PCA, na figura 23) e guardadas num período de dois meses no excitador.

A figura 23, na página seguinte, apresenta a análise por PCA das amostras Controlo (a vermelho) e as G₃₃ (a verde) da fase exponencial. No gráfico em cima, os *scores*, confirmou-se a existência de uma separação nítida entre ambas as células. A separação é explicada quase na totalidade, com sensivelmente 87.29% de variabilidade, pela primeira componente, PC1, pois a segunda componente, PC2, apresenta somente 4.12% da explicação. Esta separação entre as células justifica-se, observando o gráfico de *loadings* da primeira componente, pelas quantidades de metabolitos presentes. Observou-se também a separação de uma amostra nos Controlos, contudo não se torna significativo devido à reduzida percentagem apresentada na segunda componente.

Em estudos anteriores, observou-se que quando ocorrem erros de tradução, G₃₃ e T₃₃, existe uma activação de 43 proteínas pertencentes à resposta de stress e à degradação de outras proteínas, mas também ocorre uma diminuição da actividade de 34 proteínas que

pertencem ao metabolismo dos aminoácidos e à síntese proteica. Também ocorre agregação de proteínas que, atingindo a saturação, inicia o processo de degradação das mesmas [47]. Ou seja, quando ocorrem erros de tradução através destes plasmídeos, iniciando na fase exponencial, as amostras G₃₃ apresentam determinadas alterações no seu metabolismo, um exemplo são os aminoácidos livres, que ao fim de existir uma saturação da agregação proteica inicia-se a destruição das mesmas aumentando assim o número de aminoácidos livres. Para além destas mudanças também ocorrem alterações em outras vias metabólicas apresentando também diferenças nos metabolitos entre as células transformadas.

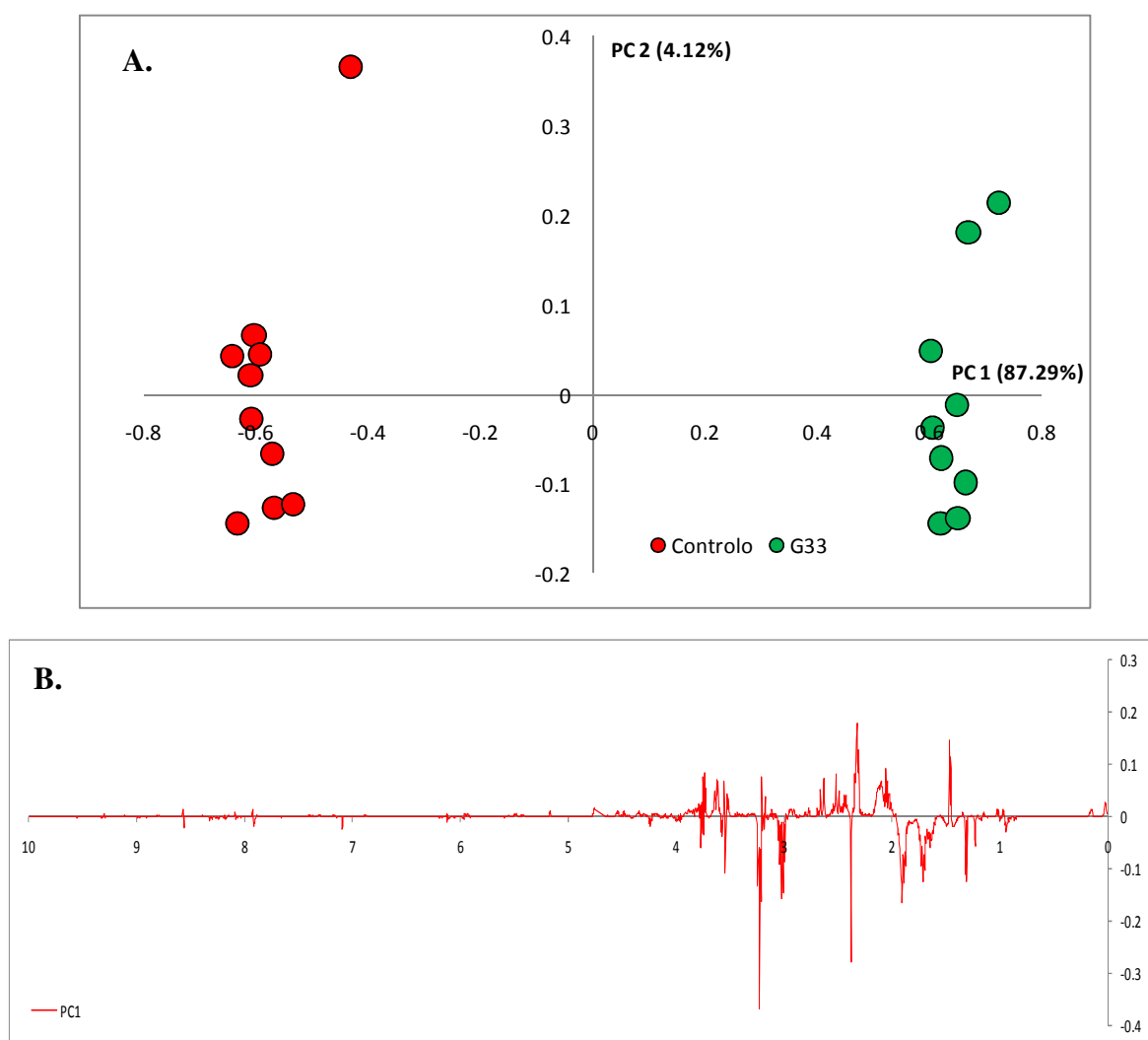


Figura 23 – PCA das amostras da fase exponencial das células Controlo e G₃₃.

A. Gráfico dos Scores da análise por PCA. B. Gráfico dos Loadings da respectiva análise.

O resultado obtido anteriormente fora ligeiramente alterado quando na análise por PCA se adicionaram os espectros das amostras armazenadas aos restantes espectros. (As amostras armazenadas em pó também foram reconstituídas com uma solução tampão fosfato contendo D₂O e obtiveram-se novos espectros para análise por PCA.)

Observando o PCA da figura seguinte, figura 24, onde a cor vermelha representa o Controlo, a verde as células G₃₃, o amarelo o Controlo armazenado e a cor violeta representa as células G₃₃ armazenado, confirmou-se que não é possível utilizar nenhuma amostra já anteriormente preparada. Esta situação também não poderá ocorrer mesmo quando as amostras ficam guardadas no excitador para a comparação de perfis entre as células, pois, tanto as amostras Controlo como as G₃₃ armazenadas apresentam-se distanciadas das respectivas amostras iniciais.

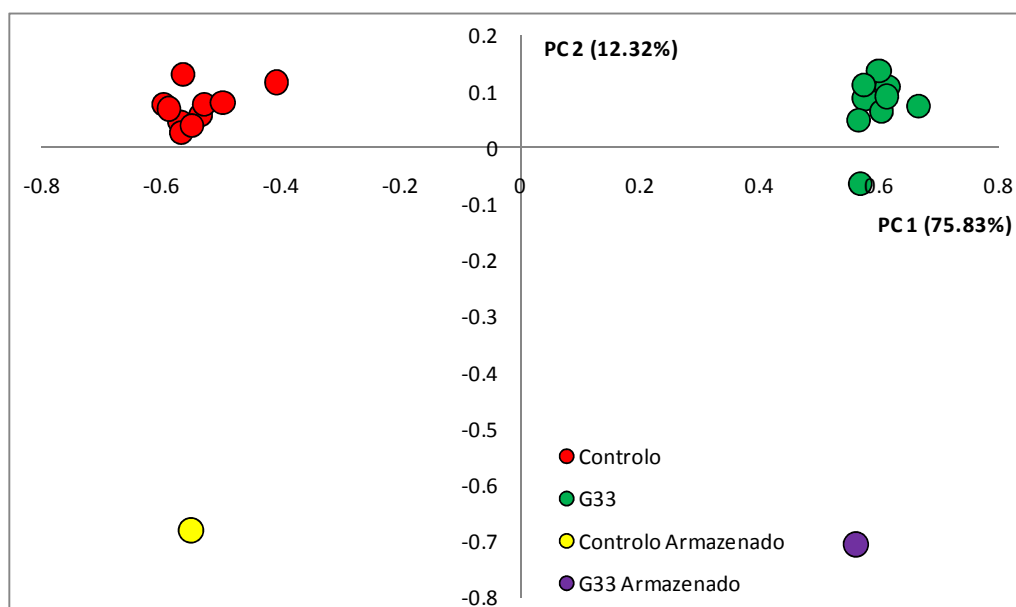


Figura 24 – Teste de armazenamento das amostras da fase exponencial, gráficos dos *scores* da análise por PCA.

As células Controlo estão apresentadas a vermelho e a verde as células G₃₃. Com a cor amarela, o Controlo armazenado e com a cor violeta, as células G₃₃ armazenadas, ambas durante dois meses no excitador.

O resultado obtido diferiu ligeiramente em relação ao primeiro PCA da figura 23, ou seja, existe uma separação entre células com o mesmo plasmídeo, mas também apresenta uma separação entre as amostras iniciais e as amostras armazenadas. Obteve-se para a primeira componente, uma percentagem de 75.83% de explicação da variabilidade e para a segunda componente apenas 12.32%. Através destes valores verificou-se que a separação é explicada, quase na totalidade pela primeira componente, como no PCA anterior, e existe

uma separação bem clara das amostras armazenadas e as mesmas amostras sem serem armazenadas explicada pela segunda componente. Este resultado comprovou que as amostras não são idênticas, a nível de perfil metabólico, pois não se encontram próximas das amostras originais correspondentes e, conseqüentemente, não poderão ser usadas na análise mesmo apresentando a mesma separação na primeira componente.

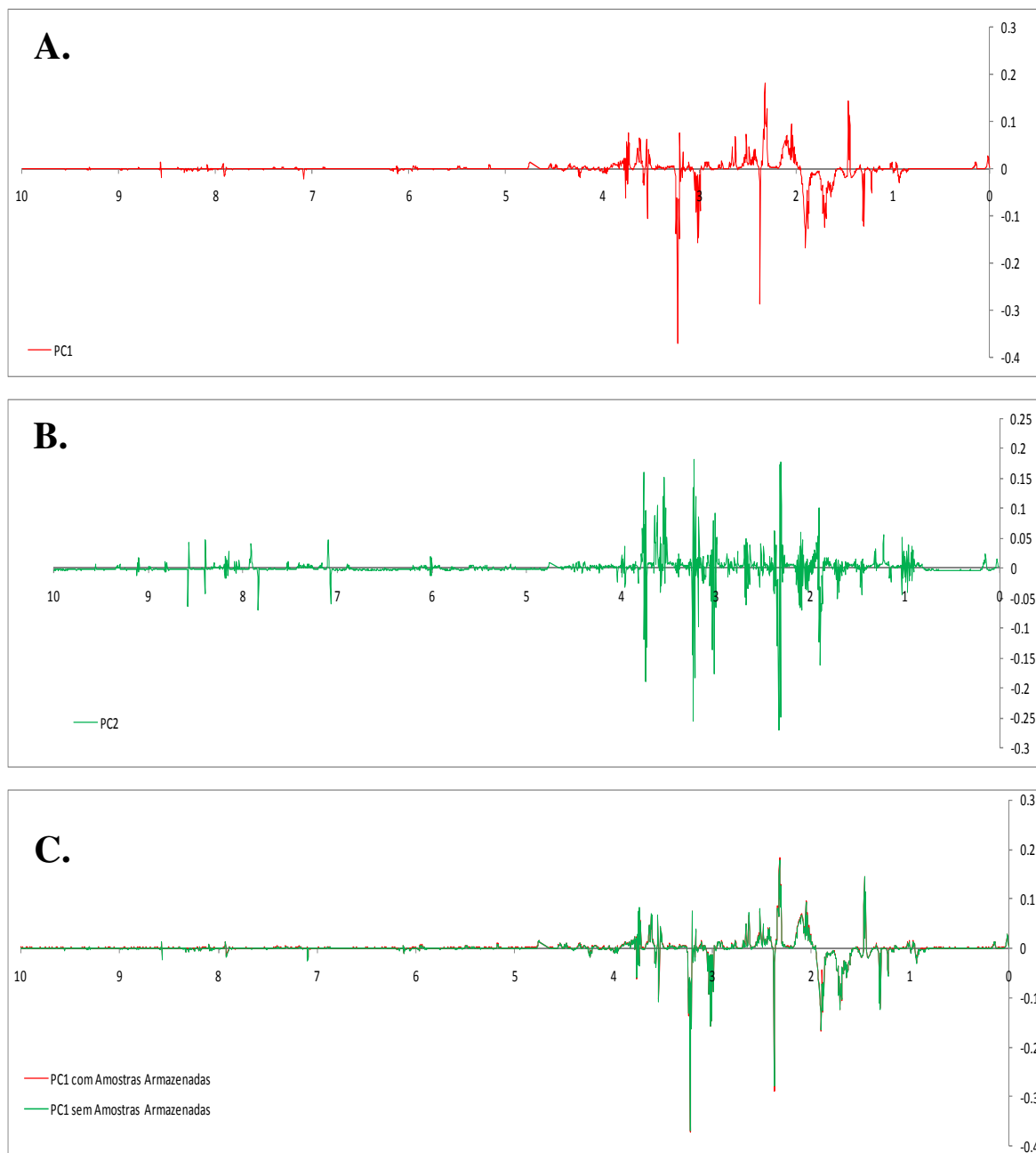


Figura 25 – Gráficos dos *Loadings* da análise por PCA para o teste de armazenamento das amostras.

Gráfico A. *Loadings* do PC 1 das amostras Controlo e G₃₃ e as respectivas amostras armazenadas durante dois mês. Gráfico B. *Loadings* do PC 2 das amostras Controlo e G₃₃ e as respectivas amostras armazenadas durante dois mês. Gráfico C. *Loadings* sobreposição dos dois PC 1 das amostras Controlo e G₃₃, com e sem as respectivas amostras armazenadas durante dois mês.

Comparando os *loadings* da primeira componente das amostras Controlo e G₃₃ com os *loadings* da primeira componente das amostras originais com as amostras armazenadas, gráfico C., da figura 25, observou-se que estes são idênticos e que a separação entre amostras é apenas explicada pelo gráfico dos *loadings* do PC2, gráfico B. da figura 25. Consequentemente, não se devem utilizar amostras guardadas em excicadores, pois de alguma forma, alguns compostos contidos nas amostras poderão ser instáveis durante um período longo de armazenamento. A humidade e outros factores desconhecidos, poderão também conduzir a alterações a nível de composição dos compostos e comprometer todo o perfil metabólico. Não se podendo utilizar amostras guardadas, necessitou-se sempre de crescer novas células para a aquisição de espectros por NMR das novas amostras obtidas.

Neste trabalho a utilização de diferentes meios de crescimento também foi alvo de estudo. Testaram-se dois diferentes meios: YPD [39], meio rico; e SD [39], meio mínimo. Ambos foram autoclavados de forma a obter a condição asséptica, evitando contaminações com outros microrganismos. A morte das células microbianas por acção do calor húmido resulta da desnaturação das proteínas e da destabilização da membrana citoplasmática.

Os meios contidos nos erlenmeyers, durante o processo de autoclavagem, permanecem em níveis diferentes, ou seja, alturas diferentes dentro da autoclave. Consequentemente, nem todos os meios ficam sujeitos à mesma temperatura. Como os meios YPD, contêm glucose na sua composição, quando em contacto com aminoácidos e estes ficam sujeitos a temperaturas diferentes devido à altura, alguns dos meios ficam mais escuros do que outros (reacção de Maillard) [53]. Esta diferença poderá alterar de alguma forma o crescimento das células e, consequentemente, poder-se-ão obter diferentes perfis metabólicos, para as células com o mesmo plasmídeo, nos diferentes erlenmeyers. Existem algumas formas de contornar este factor, uma delas é através de filtros de esterilização, onde se passa a glucose necessária para os meios através dos filtros e o restante da composição é autoclavado. Deste modo não se corre qualquer risco de existirem diferenças a nível de perfis. Devido à falta de meios disponíveis torna-se um pouco incómodo passar grandes quantidades de glucose por pequenos filtros e consequentemente despende-se bastante tempo na esterilização da glucose.

Ainda em relação à esterilização, deve-se ter em atenção à não existência de contaminação ao longo do processo de crescimento. Caso haja contaminação por bactérias, esta torna-se

visível no final do processo de centrifugação, pois os meios ficam turvos e os pellet apresentam duas zonas distintas. Nestes casos, correndo o risco de obter extractos metabólicos de todos os organismos presentes e influenciar os resultados, não se devem utilizar os pellets contaminados.

Outros factores como, a luz, a humidade e a temperatura ambiente poderão também alterar de alguma forma os meios de crescimento, a nível da composição, que permanecem nas bancadas. Por exemplo, ficando os meios, já autoclavados, mais do que um dia em cima da bancada, estes poderão evaporar e, consequentemente, ficarem mais concentrados. Esta diferença poderá alterar o crescimento entre erlenmeyers e levar a resultados errados. Mas, como descrito anteriormente, alguns destes factores são quase impossíveis de controlar e estarão sempre presentes, qualquer que seja a metodologia utilizada.

Outro factor importante que foi necessário controlar foi a abertura, vezes sem conta, dos erlenmeyers. No início deste trabalho, durante os crescimentos das células transformadas, esta acção era muito frequente pois era necessário saber a que OD se encontravam os meios. O retirar dos erlenmeyers das incubadoras faz com que os crescimentos sejam perturbados, devido à cessação dos movimentos giratórios e alteração da temperatura. A ocorrência de uma alteração nos crescimentos leva a que todos os que fossem perturbados apresentassem diferentes ODs no momento da recolha das células e, consequentemente, apresentassem um número diferente de células e diferentes perfis metabólicos. Como veremos mais adiante, este factor foi resolvido, com o estudo das curvas de crescimento das células com os respectivos plasmídeos. Assim, não houve necessidade de perturbar mais nenhum erlenmeyer durante o crescimento para saber a que OD se encontravam os meios.

Com o objectivo de obter perfis metabólicos, tanto na fase exponencial como na fase estacionária, a escolha dos meios de crescimento torna-se fundamental. Os perfis das células transformadas diferem tanto para o meio mínimo como para o meio rico. Consequentemente, deve-se ter em conta que para as células contendo o mesmo plasmídeo, usa-se um meio rico (YPD) ou então um meio mínimo (SD), mas nunca os dois em simultâneo, para posteriormente se realizarem comparações entre células contendo os plasmídeos. Ou seja, crescendo as células em meios distintos obtêm-se perfis completamente diferentes.

A influência da composição dos meios encontra-se ilustrada na figura seguinte, figura 26, onde se visualiza uma separação nítida entre dos dois meios.

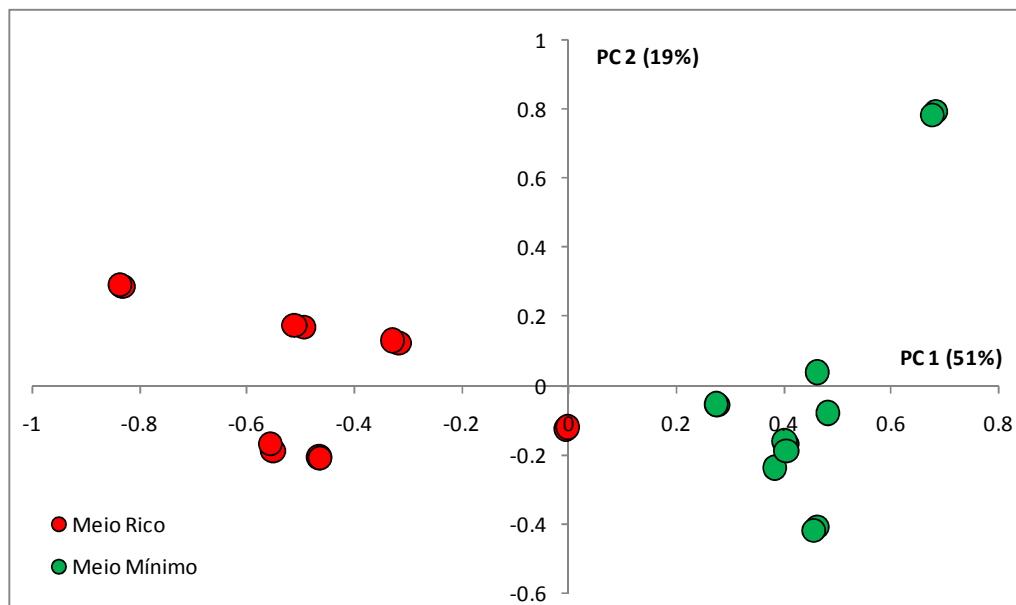


Figura 26 – Gráfico dos Scores com os vários meios, meio rico e meio mínimo.

Separação das amostras Controlo em meio rico a cor vermelha e meio mínimo a cor verde.

A cor vermelha representa as amostras das células Controlo crescidas em meio rico e a verde as células Controlo crescidas em meio mínimo. Esta diferença entre meios deve-se ao facto de o meio mínimo apresentar menos nutrientes, comparado com o meio rico, resultando na indução de stress às células e estas automaticamente produzirem mais trealose e glicogénio. A produção destes dois metabolitos enquadra-se no mecanismo de defesa que as células apresentam em situações de stress. O glicogénio não foi visualizado nos espectros adquiridos, pois sendo uma macromolécula, ficou retida nos centríficos (Amicon® Ultra 5 MWCO, MILLIPORE e Vivaspin 15R 5.0 MWCO, Sartorius Stedim) durante a filtração.

A figura 27 apresenta o gráfico dos *loadings* relativamente à primeira componente principal (PC 1), com a identificação dos sinais da trealose. Esta tem como objectivo comprovar que a separação entre as amostras das células Controlo, crescidas nos dois meios, foi devida fundamentalmente a esse metabolito. Mas, para além da trealose,

também existem outros metabolitos responsáveis pela separação entre amostras, como por exemplo alguns aminoácidos e glicerol.

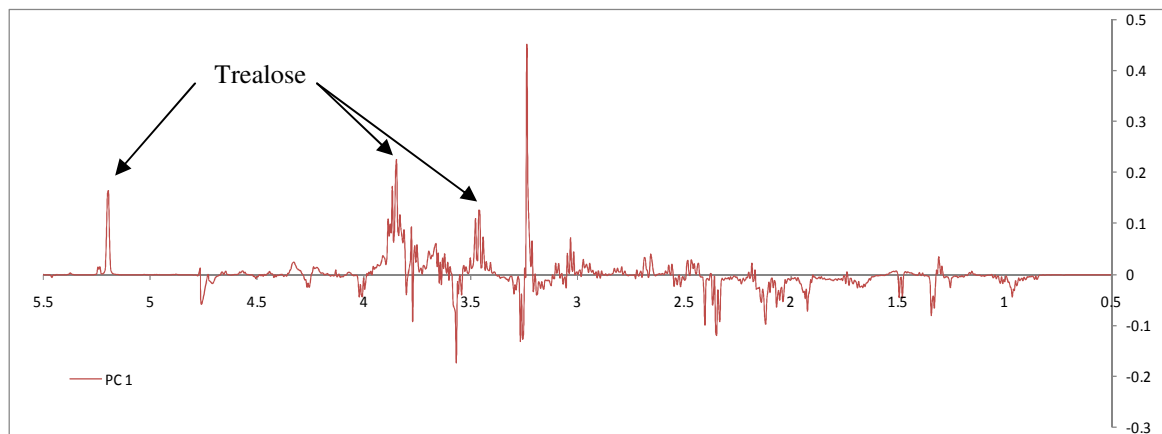


Figura 27 – Gráfico de *Loadings* das amostras Controlo do meio rico e mínimo.

A diferença entre os dois meios de crescimento é o facto do meio mínimo apresentar menores quantidades de nutrientes, o que consequentemente acarreta stress às células durante o crescimento.

Uma vez mais, confirmou-se que existindo diferenças nos meios e nos procedimentos de crescimento, aparecem diferenças metabólicas e, automaticamente, a variabilidade entre essas amostras aumenta. Essa variabilidade foi minimizada para que posteriormente fosse possível proceder às comparações entre as diferentes células transformadas. Outro parâmetro tido em conta, e verificado também pelo PCA, figura 28, foram os cuidados a ter na obtenção das amostras em diferentes dias.

No gráfico apresentado na página seguinte, verificou-se que a amostra assinalada a cor verde se encontra afastada das restantes amostras. Esta amostra foi preparada utilizando diferentes parâmetros, pois existem determinados factores (temperatura, percentagem de humidade, intensidade da luz, etc...) que são diferentes em dias diferentes. Neste estudo, teve-se em atenção obter em simultâneo todas as amostras das células com o mesmo plasmídeo nas mesmas condições experimentais, de forma a obter sempre um perfil metabólico semelhante entre as mesmas células transformadas. Contudo, serão sempre difíceis de controlar, obtendo-se sempre alguma variabilidade entre células com o mesmo plasmídeo.

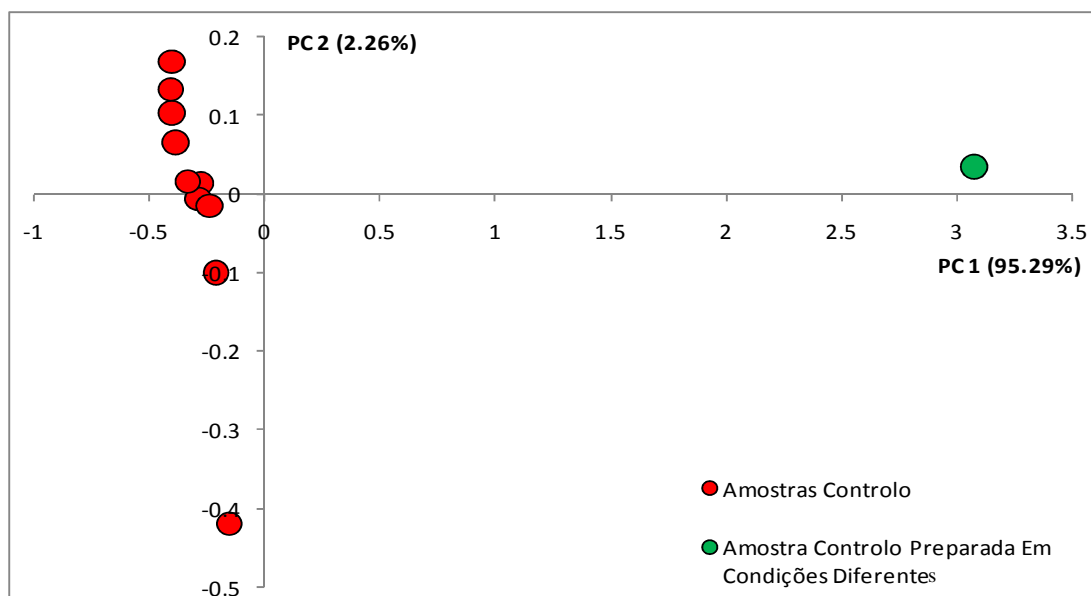


Figura 28 - Gráfico de Scores assinalando a separação das amostras preparadas em diferentes Condições.

Demonstra-se que se deve manter as mesmas condições experimentais para todas as mostras de forma a obter perfis metabólicos comparáveis.

Com algumas variáveis experimentais descritas, torna-se muito importante estudar e observar a forma como as células crescem, relacioná-las com os meios de crescimentos e com outros factores que serão abordados em seguida.

Curvas de Crescimento

Neste estudo teve-se também em atenção às densidades ópticas, ODs. Durante os crescimentos das leveduras existem, como referido na introdução, várias fases de crescimento que envolvem diferentes ODs e diferentes fases metabólicas. Assim, de forma a obter um perfil idêntico para as células contendo o mesmo plasmídeo, foi necessário recolher as células com sensivelmente a mesma OD e consequentemente com o mesmo número de células. Sem abrir os erlenmeyers, de forma a não perturbar os crescimentos, necessitou-se relacionar os tempos de crescimento com as ODs.

Através de estudos realizados anteriormente, as células foram inicialmente recolhidas numa fase estacionária, com uma densidade óptica compreendida entre 1.9 e 2.5, e observou-se que a separação das células Controlo, G₃₃ e T₃₃ devia-se sobretudo à trealose, figura 29. Mais uma vez, confirmou-se que a trealose é um dos metabolitos produzidos pelas células quando estas se encontram na fase estacionária ou numa situação de stress. Observando o espectro em seguida, onde as células foram recolhidas a uma OD de 1.66, observou-se a presença de trealose em grandes quantidades.

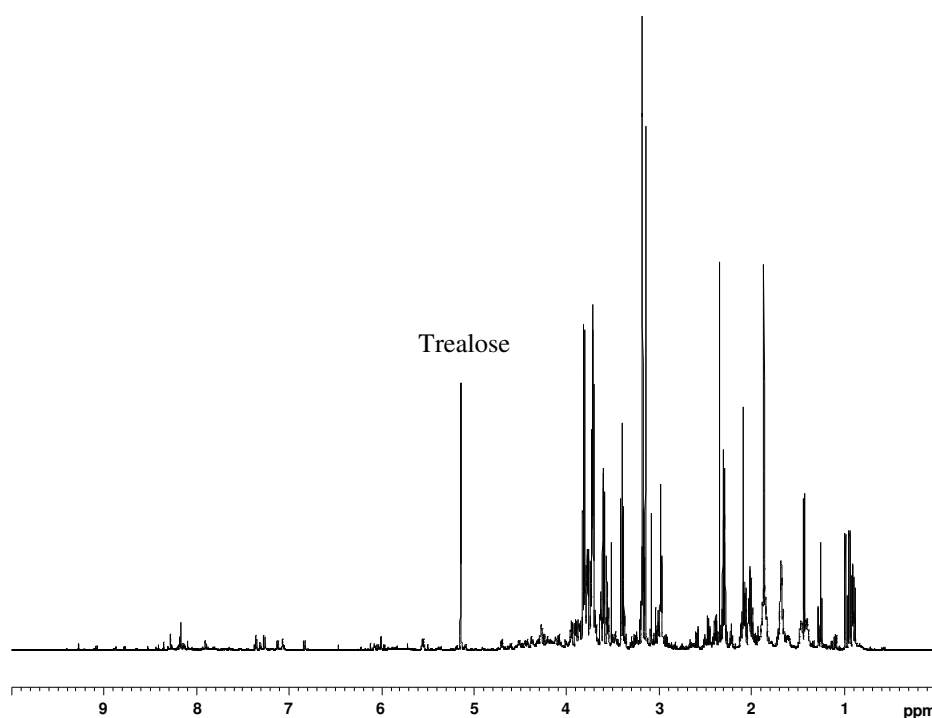


Figura 29 – Espectro de uma amostra Controlo recolhida a uma OD de 1.66.

A tabela 2, apresentada em seguida, contém as ODs de algumas amostras iniciais, antes de serem estudadas as curvas de crescimento. Verificou-se que as ODs dos inóculos variam, o que indica que as amostras não apresentam o mesmo número de células. Assim, nos casos em que temos mais células, podemos ter mais metabolitos extraídos fazendo com que existam maiores concentrações.

Neste caso, foi necessário estudar as curvas de crescimento das células (Controlo, G₃₃ e T₃₃), de forma a controlar a variável, anteriormente descrita, e saber onde e quando se deveriam recolher as células ao longo da curva.

Este estudo teve como objectivo que os inóculos apresentassem, durante a recolha das células, a mesma OD e o mesmo número de células, de forma que todos os inóculos apresentassem a mesma fase de crescimento e o mesmo metabolismo.

Tabela 2 - Tabela de ODs de algumas primeiras amostras

Células	Meio	OD do Pré-Inóculo	OD do Inóculo Final
Controlo	Rico	1.66	2.22
		1.66	2.00
		1.66	1.98
		1.66	1.65
		1.66	2.43
		0.59	1.25
		0.59	0.99
		0.59	1.16
G₃₃	Rico	2.19	2.78
		2.19	2.07
		2.19	2.42
		0.19	1.24
		0.19	1.62
		0.19	0.73
T₃₃	Rico	2.21	2.35
		2.21	2.22
		2.21	2.19

Ao estudar os crescimentos das células transformadas verificou-se que ao longo do tempo os pH's dos meios variavam, e no final obteve-se um gráfico que relacionava o pH e as ODs ao longo do tempo, para cada um deles.

As células utilizadas neste estudo, com os diferentes plasmídeos, não apresentam o mesmo crescimento quando comparadas com as mesmas sem plasmídeos. Esta característica foi observada nos valores obtidos pelas ODs, em que nas células sem plasmídeos se encontravam na fase estacionária, na qual apresentavam ODs compreendidas entre 6 a 7. Já as células com os plasmídeos, também para a mesma fase de crescimento, apresentavam ODs compreendidas entre 1.8 a 2.5.

Também se deu especial atenção aos pré-inóculos e foi necessário ter em conta qual o objectivo e importância nos crescimentos celulares. Os pré-inóculos tornam-se fundamentais e têm como objectivo, ao fim de algum tempo, fazer com que todas as células se encontrem na mesma fase de crescimento. Ou seja, os pré-inóculos servem para crescer as células até à fase estacionária e quando os nutrientes do meio escasseiam, essas mesmas permanecem nessa fase de crescimento. Assim, ao transferir um determinado volume do pré-inóculo para o inóculo com um determinado número de células, estas encontram-se sensivelmente na mesma fase, a fase estacionária. Através deste processo evitou-se o risco de as células apresentarem fases distintas de crescimento nos inóculos. Quando as células se deparam com um novo meio, com maiores quantidades de nutrientes, passam automaticamente da fase da latência (fase de adaptação) para a fase exponencial. Com isso, não se deve transferir células do pré-inóculo para o inóculo sem se medir a OD, caso contrário não se saberá o volume correcto a transferir para se iniciar os crescimentos, mas fundamentalmente não se saberá se as células do pré-inóculo se encontram na fase estacionária.

Inicialmente, foram feitos alguns teste de ODs de forma a saber a que valores se deveriam iniciar os crescimentos nos inóculos e de que forma este parâmetro poderia influenciar os crescimentos. Observando a figura 30, constatou-se que o crescimento é sensivelmente idêntico, ou seja, existem as mesmas fases de crescimento, começando tanto a 0.05 como a 0.1 de OD.

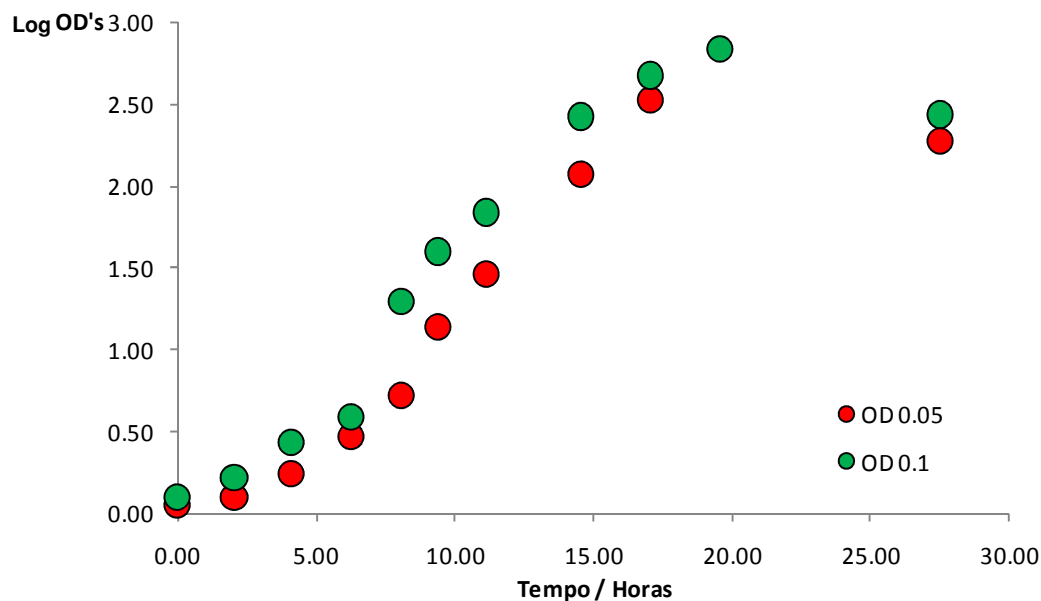


Figura 30 – Teste das ODs das células controlo.

O crescimento é sensivelmente idêntico, ou seja, existem as mesmas fases de crescimento, começando tanto a 0.05 como a 0.1 de OD.

Através dos resultados obtidos, e sendo necessárias quantidades suficientes de células para a obtenção das amostras para posteriormente se adquirirem os espectros de NMR, optou-se por começar os crescimentos dos inóculos com uma OD de 0.1. Como a medição da densidade óptica constitui um método rápido de estimar a concentração celular nas soluções, significa que começando a 0.1 e observando a figura anterior, obteve-se sempre uma maior OD para qualquer fase de crescimento e automaticamente uma maior concentração celular. Ou seja, se as fases foram as mesmas para todos os tempos tanto começando a 0.05 como a 0.1, e se torna necessário o maior número de células possível, todos os inóculos foram inoculados com uma OD de 0.1.

Os crescimentos foram iniciados com uma OD de 0.1 com o objectivo de obter maiores quantidades de células e de diminuir os tempos de crescimento. As células ao começar a 0.1 passaram quase directamente para a fase exponencial, ficando pouco tempo na fase de latência ou seja no período de adaptação. No entanto, não se deve aumentar este valor em demasia, pois caso contrário o número de células iniciais no inóculo será excessivo. Caso isso aconteça, poderá não existir um número de divisões suficientes o que fará com que as células não passem pelas várias fases de crescimento, resultando num menor número de células a recolher sem se encontrarem na fase de crescimento pretendida.

O estudo das curvas de crescimento demonstrou ser importante, pois através dele obteve-se a solução para alguns problemas existentes nos métodos utilizados até aquele momento. Diminuir a variabilidade entre amostras, obter de quantidade suficientes de amostras em pó no final da segunda liofilização, evitar os diferentes perfis obtidos entre os mesmos plasmídeos, onde e ao fim de quanto tempo se devem recolher as células, evitar as aberturas dos erlenmeyers de forma a saber as ODs, enfim todas estas variáveis foram resolvidas com os resultados do estudo das respectivas curvas de crescimento das células com os respectivos plasmídeos. Os resultados estão apresentados nas figuras seguintes, figura 31, 32 e 33.

Obtidas as três curvas de crescimento, onde se relacionou ao longo do tempo as ODs e os pH's, ficou-se em condições de saber quanto tempo era necessário deixar crescer os inóculos e a que valores das ODs se iriam recolher as células para cada fase de crescimento.

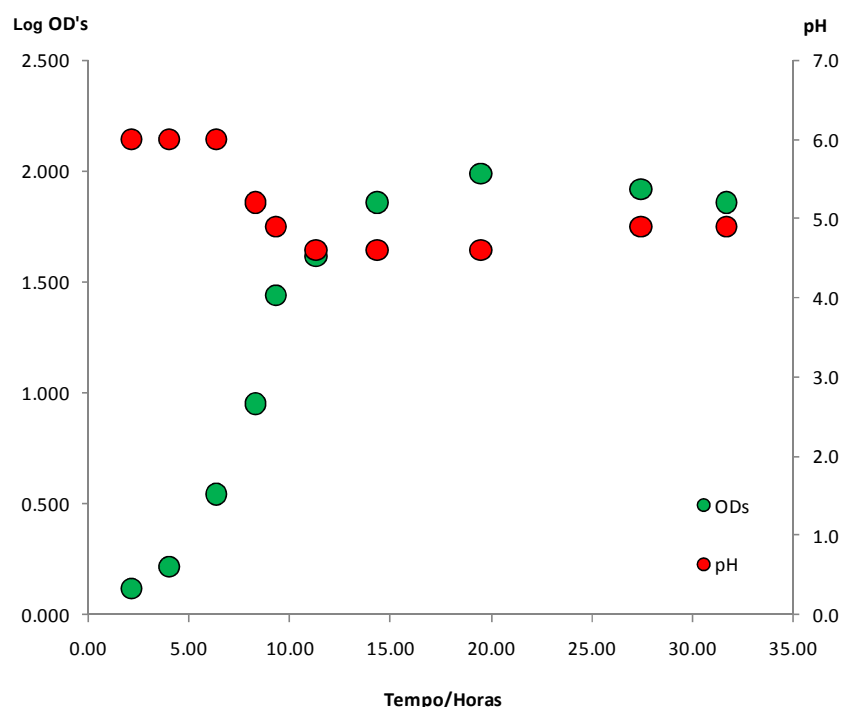


Figura 31 – Curva de Crescimento das Células Controle

Ao fim de 6 horas ocorre um decréscimo no pH (começando a zona *Diauxic Shift*) até à sua estabilização, começando aí a fase estacionária.

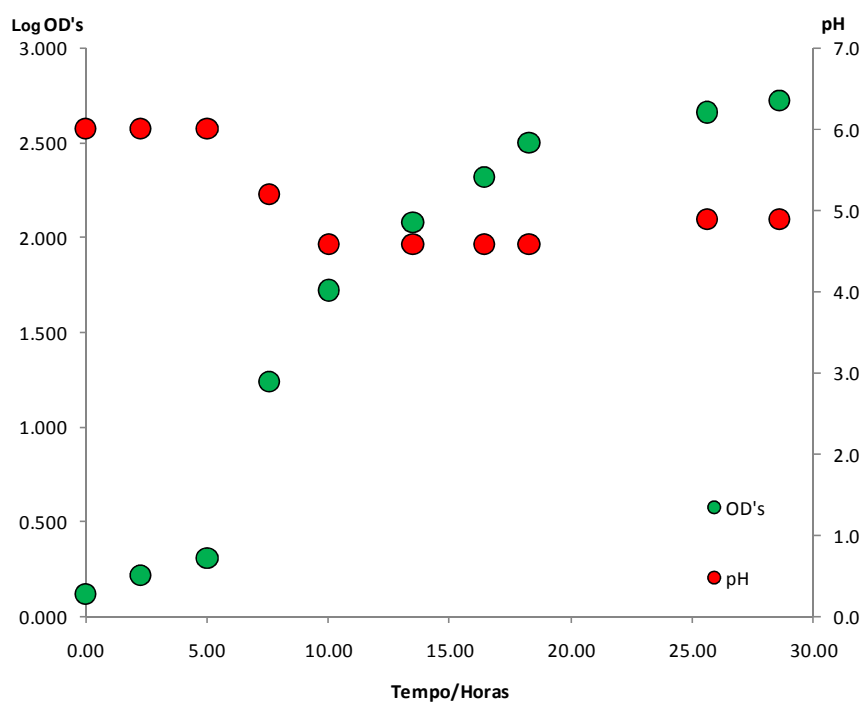


Figura 32 – Curva de Crescimento das Células G₃₃.

Ao fim de 6 horas ocorre um decréscimo no pH (começando a zona *Diauxic Shift*) até à sua estabilização, começando aí a fase estacionária.

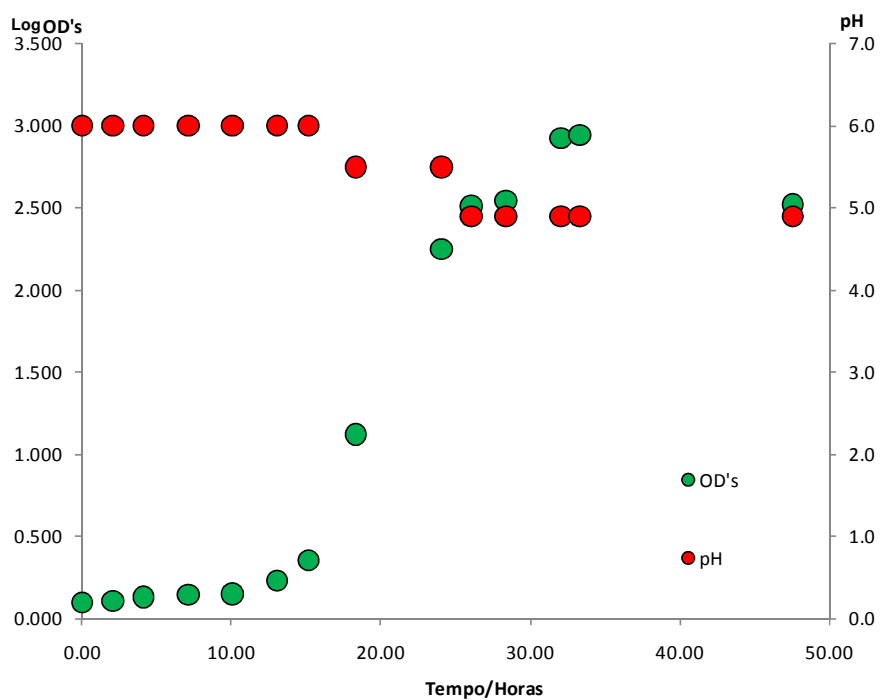


Figura 33 – Curva de Crescimento das Células T₃₃.

Ao fim de 13 horas ocorre um decréscimo no pH (começando a zona *Diauxic Shift*) até à sua estabilização, começando aí a fase estacionária.

Comparando as três curvas de crescimento (figuras 31, 32 e 33) observou-se que as células Controlo apresentam ODs inferiores em relação às células restantes, verificando-se também que as células T₃₃ apresentam a maior OD. Isto pode dever-se ao facto destas últimas apresentarem maior número de inserções aleatórias do aminoácido serina. Ou seja, quanto maior a percentagem de erros, maior poderá ser a OD apresentada na fase estacionária. Contudo, estas últimas apresentam um crescimento lento em relação às restantes células.

Outra característica observada nas três curvas de crescimento foi o decréscimo do pH ao fim de algum tempo. Isso deve-se, como já descrito anteriormente, à alteração do metabolismo das células. Durante essa zona de decréscimo do pH até à sua estabilização é designada por “*Diauxic Shift*”. Essa área representa uma zona de mudança e de desaceleração do crescimento das células, onde as mesmas passam de um processo anaeróbico para aeróbico. Como essa zona se apresenta muito instável a nível metabólico, não foi utilizada para a recolha das células para o estudo metabonómico. Contudo, esta serviu como sinalizadora do final da fase exponencial, como será descrito mais adiante.

Como um dos objectivos do estudo das curvas de crescimento foi verificar a variação do metabolismo das células ao longo do seu crescimento, realizou-se a análise por PCA através dos espectros obtidos das amostras das curvas de crescimentos.

O gráfico de *scores*, figura 35, apresentou quatro áreas diferentes e comprovou que ao longo do crescimento das células transformadas o respectivo metabolismo difere. Através deste resultado comprovou-se que não era possível utilizar amostras de extractos de células recolhidas em qualquer fase das curvas de crescimento para a obtenção de perfis metabólicos e posteriormente realizar comparações entre elas.

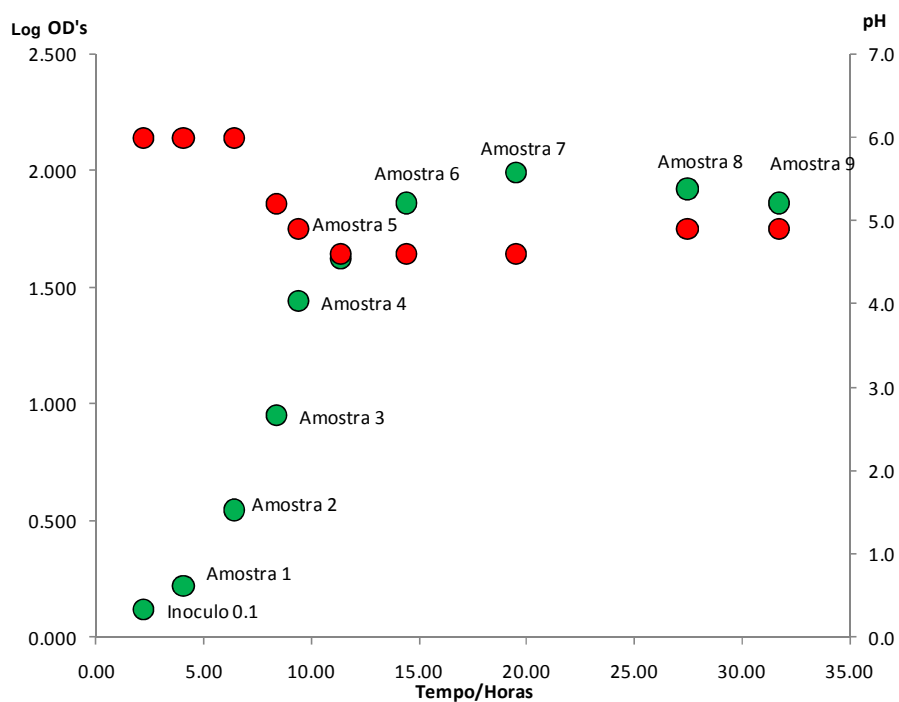


Figura 34 – Curva de crescimento das amostras Controlo ao longo da curva de Crescimento.

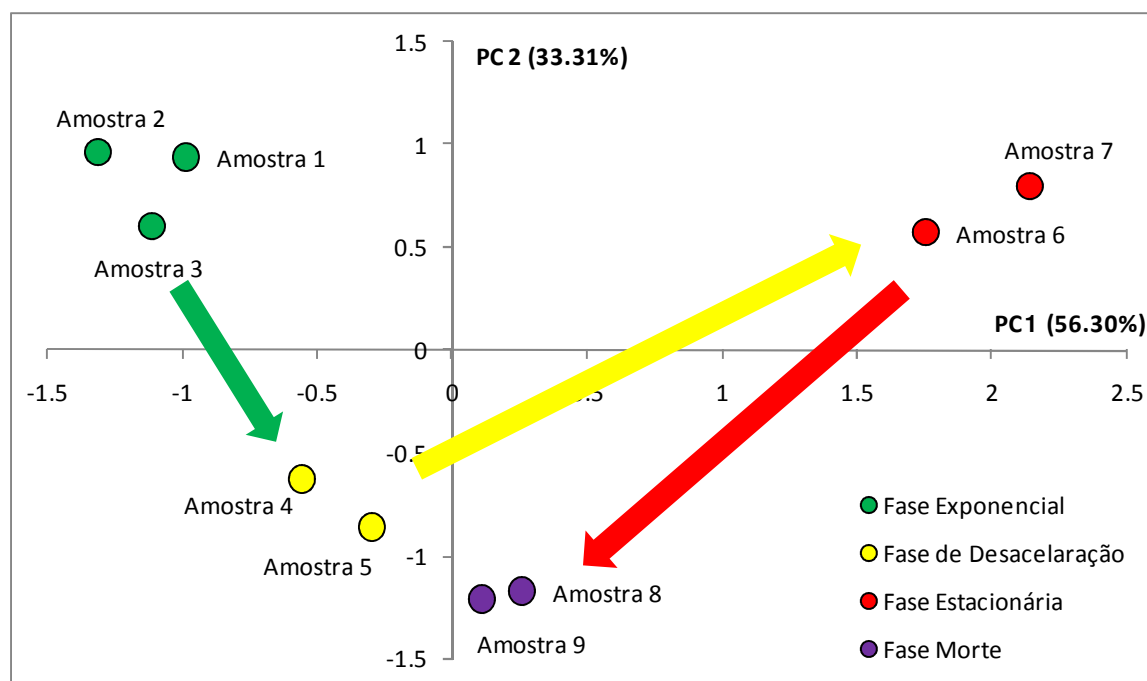


Figura 35 – Gráfico de *scores* obtido das amostras Controlo ao longo da curva de crescimento.

Analisando mais detalhadamente a curva crescimento, figura 34, e o gráfico de *scores*, também se confirmou que as quatro zonas distintas representavam as quatro fases de crescimento: as amostras de 1 a 3 representam a fase exponencial, as amostras 4 e 5 representam a fase de desaceleração; as amostras 6 e 7 representa a fase estacionária e por fim as amostra 8 e 9 a fase morte. A fase de latência não está representada no gráfico, pois os crescimentos facilmente se adaptam ao meio e ao começaram com uma OD de 0.1 fazem com que as células passem automaticamente para a fase exponencial.

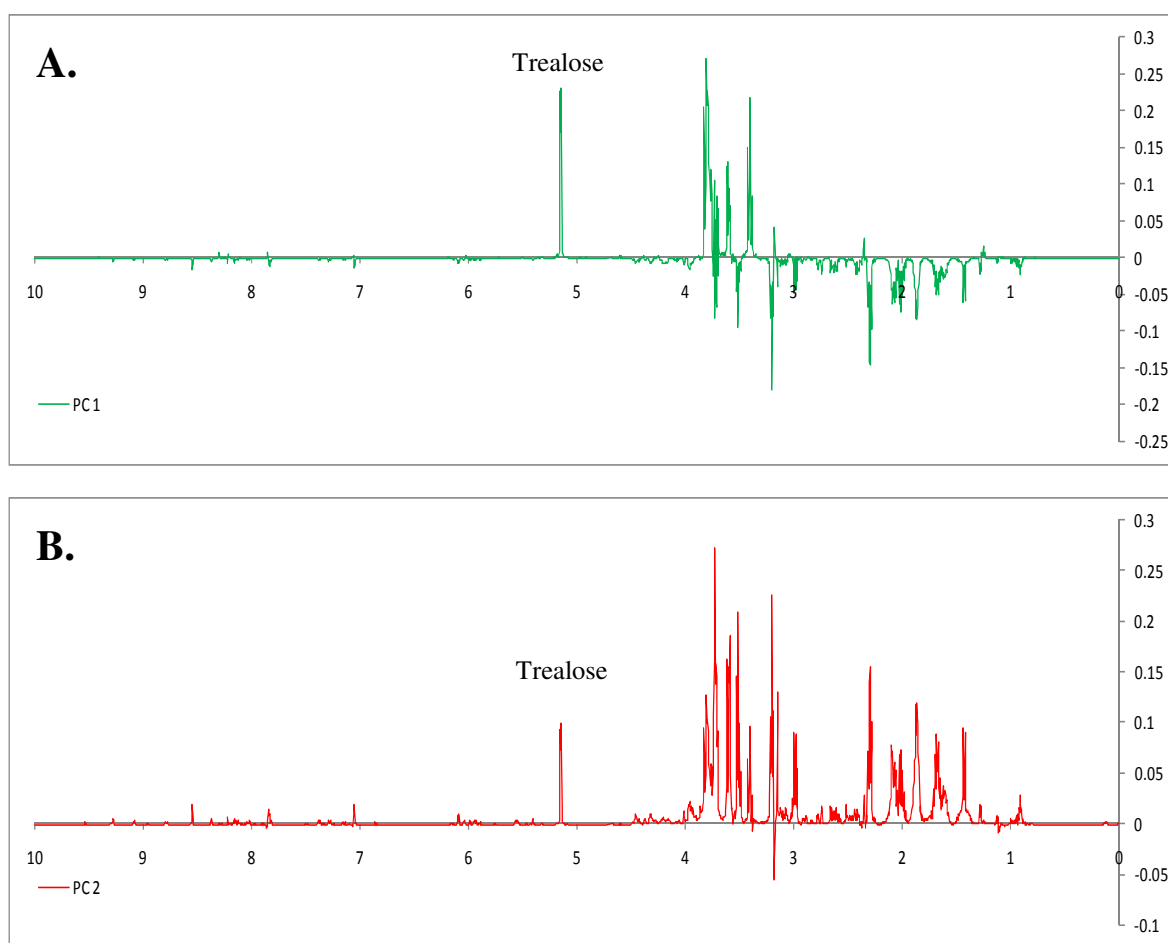


Figura 36 – Gráfico de *Loadings* das amostras Controlo ao longo da curva de crescimento.

Gráfico **A.** *Loadings* do PC 1 das amostras Controlo da Curva de Crescimento. Gráfico **B.** *Loadings* do PC 2 das amostras Controlo da Curva de Crescimento.

Observando os *loadings* do PCA, mais propriamente o gráfico **A.**, relativamente à primeira componente principal (PC 1), das amostras Controlo ao longo da curva de crescimento, figura 36, confirmou-se que as amostras 6 e 7 encontram-se na fase estacionária, pois

apresentam maiores quantidades de trealose comparadas com as restantes amostras. Ou seja, tornando visível a separação entre a fase estacionária com as restantes fases, e trealose é o metabolito que melhor reporta na fase estacionária. Também se observou que as amostras da fase de desaceleração e da fase morte encontram-se muito próximas, apresentando perfis metabólicos semelhantes. Em contrapartida, outros metabolitos, como a alanina, existe em maiores quantidades para a fase exponencial e fase estacionária, do que para as restantes fases. Logicamente, a fase estacionária apresenta maiores quantidades de metabolitos pois as células atingem maior densidade celular.

Obtidas as curvas de crescimento foi necessário verificar onde e ao fim de quanto tempo as células necessitavam de crescer para serem recolhidas com a mesma OD.

Para o perfil metabólico na zona exponencial, concluiu-se que não era possível recolher as células no início da curva, pois não se obtinham células suficientes para a obtenção das amostras e posterior aquisição dos espectros por NMR.

Devido à pouca sensibilidade do NMR e querendo obter um perfil metabólico da zona exponencial, devem-se recolher as células mesmo antes da zona metabolicamente instável. As células entram na zona “*Diauxic Shift*” sensivelmente quando ocorre a mudança de pH, através deste facto estas devem ser recolhidas um pouco antes dessa mudança. Ou seja, deve-se observar ao fim de quanto tempo é que o pH decresce nas três curvas de crescimento e um pouco antes recolhem-se as células, de forma a não correr qualquer risco em recolher as mesmas na zona “*Diauxic Shift*”. Neste caso, ultrapassou-se o problema das quantidades, pois nessa zona já existem células suficientes. Como todos os inóculos são iniciados ao mesmo tempo, obteve-se o mesmo número de células para todos eles, e por fim, não se corre o risco de recolher as mesmas numa fase metabolicamente instável.

No caso da fase estacionária teve-se em conta os valores das ODs na curva, recolhendo assim as células onde estas atingissem o valor mais elevado.

Assim, de forma a recolher as células na fase exponencial, foram necessárias 6 horas de crescimento para as células Controlo e G₃₃ e 13 horas para as células T₃₃. Para o caso da fase estacionária, observando também os gráficos, as células Controlo e G₃₃ necessitaram de 20 horas, enquanto que as T₃₃ necessitaram de 33 horas.

Observando a tabela 3 verifica-se que as ODs, após o estudo das curvas de crescimento, apresentam valores semelhantes.

Tabela 3 - Tabela de ODs de algumas amostras após o estudo das curvas de crescimento

Células	Meio	OD do Pré-Inóculo	OD do Inóculo Final
Controlo	Rico	1.68	0.740
		1.68	0.730
		1.68	0.780
		1.68	0.790
		1.71	0.730
G₃₃	Rico	1.14	0.300
		1.14	0.330
		1.14	0.330
		1.14	0.260
		1.14	0.220
		1.14	0.260

Em suma, deixando as células a crescer durante o tempo necessário para a fase de estudo, tanto exponencial como estacionária, estas irão apresentar sensivelmente a mesma OD, o mesmo número de células, o mesmo pH e o mesmo perfil metabólico. Desta forma, estudando as variáveis experimentais a controlar, sabendo o tempo necessário para recolher as células e posteriormente estudando os métodos de extracção mais eficientes dos metabolitos, fica-se em condições de obter um procedimento optimizado para obter perfis metabólicos das diferentes células transformadas e proceder ao estudo dos mesmos.

Métodos de Extracção dos Metabolitos

A extracção dos metabolitos foi um dos passos mais importantes e essenciais deste estudo. Nos casos em que a extracção não fosse bem sucedida, todo o processo consequente poderia ficar comprometido. Não existe nenhum método de extracção global que seja 100% eficiente na extracção de todas as classes de metabolitos. Existem sim, alguns métodos que favorecem algumas classes de compostos e mesmo dentro dessas classes também existem determinados compostos que não são bem extraídos.

Para a obtenção do processo optimizado de extracção global de todos os metabolitos, foram testados três métodos: método esferas de vidro [48], método de liofilização (água quente) e o método da liofilização com esferas de vidro a seco.

Na extracção por esferas de vidro, adicionou-se às amostras etanol a 75% e posteriormente procedeu-se à sua evaporação. Através dos equipamentos disponíveis, a evaporação das amostras implicou a divisão de cada uma em dois eppendorfs, tornando-se este método pouco prático. Além disso, se o processo de evaporação do etanol não fosse completo, as amostras descongelavam durante a liofilização, não sendo possível obtê-las em pó. Tal devia-se ao facto de o liofilizador utilizar uma temperatura de -40°C e o ponto de solidificação do etanol ser de -114.3°C . Nos casos em que hipoteticamente a evaporação do etanol era completa as amostras também não liofilizavam bem e o resultado obtido era uns pellets em gel e não em pó, seco. Em contrapartida, este método encontra-se descrito como bastante eficiente na extracção global dos metabolitos e comparando-o com os outros métodos existentes, este cobre de uma forma geral todos os metabolitos [48]. Contudo, para os açúcares, nomeadamente os açúcares fosfatados e os nucleótidos este método não é tão eficiente [35].

Com base no que foi descrito na introdução, durante o processo de extracção devem existir três fases: *quenching*, extracção dos metabolitos e a concentração das amostras. De uma forma geral, nos dois métodos descritos em seguida: o processo de *quenching* e de concentração das amostras são muito semelhantes. O *quenching* das células foi feito pela alteração súbita da temperatura, onde as células foram congeladas a -80°C durante dois dias. O procedimento de extracção para os dois métodos seguintes foi feito de forma

diferente. E por fim, a concentração e a desidratação das amostras foram realizadas através da liofilização.

Devido à falta de resultados na obtenção das amostras com a técnica anterior, método esferas de vidro, testou-se outro método de extracção, a técnica de congelamento rápido com azoto líquido e liofilização.

Nesta técnica foram utilizados dois ciclos de liofilização. No primeiro ciclo, procedeu-se ao congelamento rápido com azoto líquido das células para que posteriormente fossem liofilizadas. Este processo teve como finalidade continuar o processo de *quenching* e a desidratação total das mesmas. Em seguida, no segundo ciclo, adicionou-se ao material liofilizado, água ultra pura, a uma temperatura de sensivelmente 90° C e posteriormente filtraram-se todas as soluções resultantes em centricons de 5 kDa (Amicon® Ultra 5.0 MWCO, MILLIPORE) para novamente serem congeladas com azoto líquido e liofilizadas. Este segundo ciclo teve como objectivos, eliminar por filtração proteínas e todos os metabolitos com um peso molecular superior a 5 kDa, e ainda desidratar as amostras, retirando toda a quantidade de água presente para posteriormente serem analisadas por ressonância magnética nuclear, NMR.

As lavagens dos centricons, para a centrifugação, também foram muito importantes, atendendo que inicialmente os espectros apresentavam grandes quantidades de glicerol. E de forma a verificar se esse glicerol fazia parte do metabolismo das células ou se era devido aos centricons, estudaram-se as lavagens dos centricons. Normalmente, os filtros dos centricons encontram-se cobertos com uma membrana protectora, formada por glicerol. Caso o glicerol não seja removido, quase na totalidade, com as lavagens feitas com água, corre-se o risco de as amostras apresentarem mais glicerol do que o normal, nos espectros de NMR. Foram feitos alguns estudos através das sucessivas lavagens dos centricons utilizando essas lavagens foram adquiridos espectros por NMR, de forma a saber quantas lavagens eram necessárias para que o glicerol não interferisse nos espectros. Através deste estudo, os espectros demonstraram que ao fim de três lavagens de 30 minutos, o glicerol era mínimo, não influenciando os resultados.

Quanto ao método de extracção, método de liofilização, em determinados passos surgiram algumas dúvidas. No caso da destruição das paredes celulares das células para a obtenção dos extractos, torna-se muito complicado utilizar somente o processo de liofilização e da

adição de água quente, para que exista uma destruição suficiente das paredes celulares. Sendo assim, este método poderá se tornar pouco eficiente na obtenção dos extractos metabólicos. Outro passo que também suscitou algumas dúvidas foi a adição de água quente aos extractos. Este passo, teve como objectivo dissolver o produto final da primeira liofilização por completo, mas esta acção poderá fazer com que algumas enzimas, como por exemplo as proteases, sejam activadas e consequentemente alterem a composição das amostras a analisar, interrompendo o processo de *quenching*. Com isso, este passo deveria ser eliminado de forma a não correr qualquer risco de alteração das amostras. Este método de extracção também suscitou algumas dúvidas na identificação dos metabolitos, como será descrito posteriormente.

De forma a manter este resultado a nível da liofilização, procurando obter melhores rendimentos a nível de extracção e evitar a activação das enzimas presentes através da adição da água quente, alterou-se o método anteriormente utilizado.

Através da simples liofilização, onde não existe uma destruição suficiente das paredes celulares e não querendo um método onde as amostras entrassem em contacto com a água ultra pura quente, para que as enzimas não fossem activadas, alterou-se o método anterior em alguns passos permanecendo as duas fases de liofilização.

Ao fim da primeira liofilização, aos pellets das células foram adicionados somente esferas de vidro a seco. Neste caso, as esferas de vidros tiveram como objectivo destruir o maior número de membranas celulares, de forma a aumentar o rendimento na obtenção de maiores quantidades de biomaterial para análise. Neste passo, foram utilizados dois ciclos de vortexação, no qual durante 20 minutos, os pellets em conjunto com as esferas de vidro foram vortexados durante um minuto e outro minuto permaneciam em repouso em gelo. O gelo teve como finalidade, diminuir a temperatura de forma a não desnaturar as proteínas presentes, nem activar nenhuma enzimas que alterassem as amostras, atendendo a que durante o processo de vortexação com as esferas de vidro, ocorre sempre um aumento da temperatura no interior do falcon.

Nestas técnicas de congelamento rápido e liofilização, o processo de liofilização poderá, por vezes, não ser bem sucedido, ou porque as amostras apresentam grandes quantidades de sais, ou mesmo, por não estarem bem congeladas. Nestas situações, quando as amostras descongelam durante a liofilização, estas não poderão ser novamente liofilizadas para a

análise por PCA. Isto porque, esta segunda liofilização faz com que as amostras tenham sido sujeitas a duas acções, ao contrário das outras, e consequentemente aparecem separadamente das restantes amostras, figura 37, confirmando o facto de que as amostras devem ser preparadas todas utilizando o mesmo procedimento. Na figura, os pontos a verde representam as amostras liofilizadas uma só vez e a vermelha representa a amostra liofilizada a segunda vez, num dia diferente.

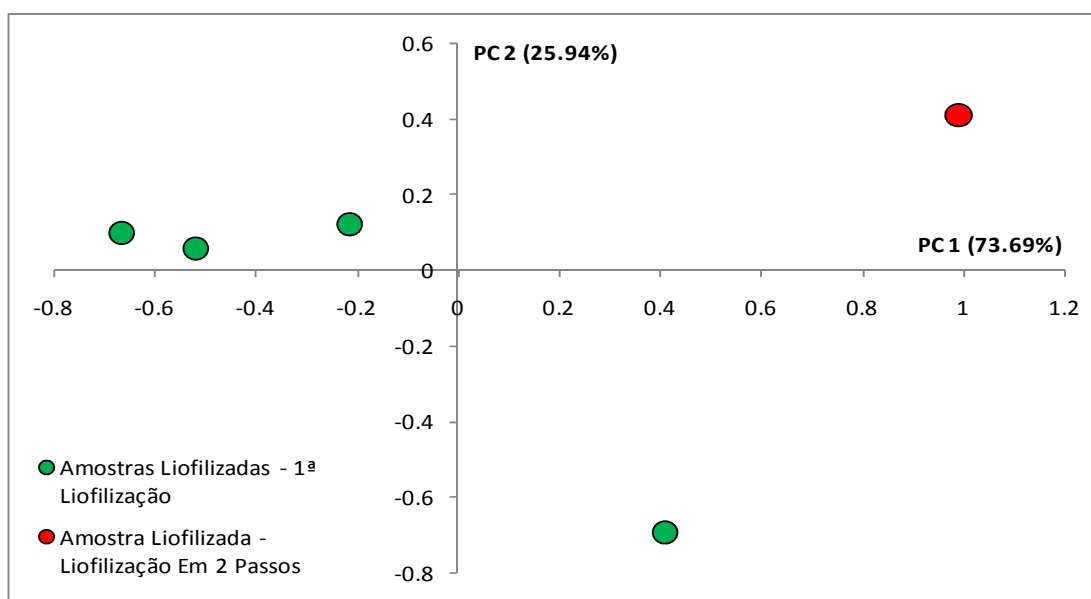


Figura 37 – Gráfico dos Scores demonstrando as amostras liofilizadas em diferentes passos.

No caso das amostras não serem preparadas nas mesmas condições experimentais, a obtenção dos perfis metabólicos fica comprometida. A amostra a vermelho foi sujeita a duas acções para ser liofilizada, apresentando-se separada em relação às restantes amostras e, consequentemente, tenha um perfil metabólico diferentes.

Também durante a liofilização, e quando se pretende estudar a fase estacionária, deve-se ter em atenção que essa fase apresenta maior quantidade de metabolitos e de sais minerais. Assim, quando se pretende realizar a segunda liofilização, devem-se diluir as amostras de forma a que as concentrações não sejam elevadas, caso contrário o processo não será bem sucedido.

Analisando os dois métodos de extracção, o método de liofilização e o método de liofilização com esferas de vidro a seco, figura 38 e 39, observou-se que os espectros de Controlo, reconstituídas com solução tampão fosfato contendo D₂O, apresentam algumas diferenças. A figura 38 representa a amostra Controlo obtida pelo método de liofilização e

a figura 39, a amostra Controlo obtida pelo método liofilização com esferas de vidro a seco. (Não será apresentado nenhum espectro do primeiro método, pois não foi possível obter amostra em pó suficiente para adquirir espectros por NMR.)

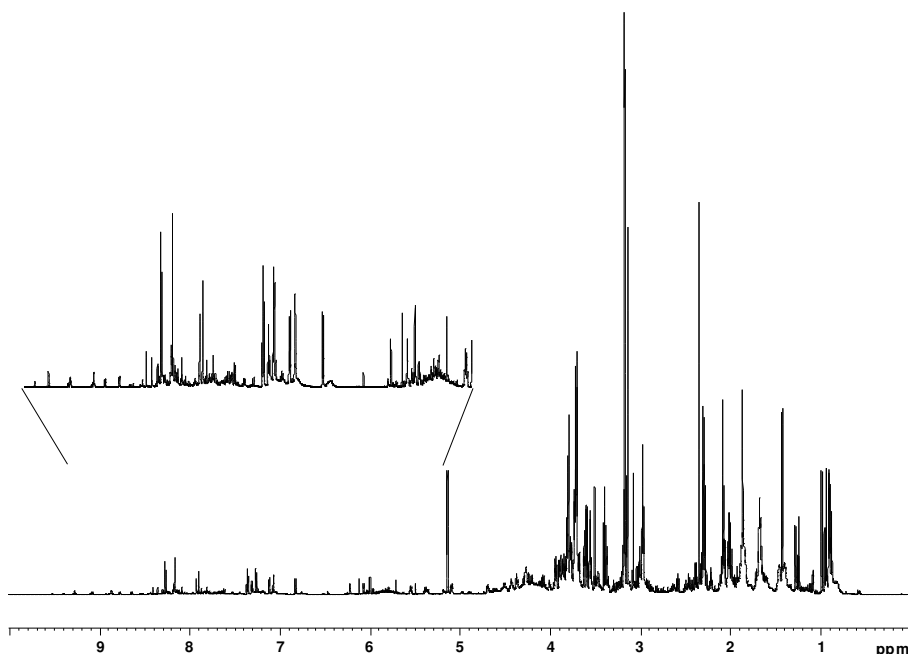


Figura 38 – Espectro 1D ^1H 500 MHz NMR da amostra Controlo pelo método de extracção Liofilização com água.

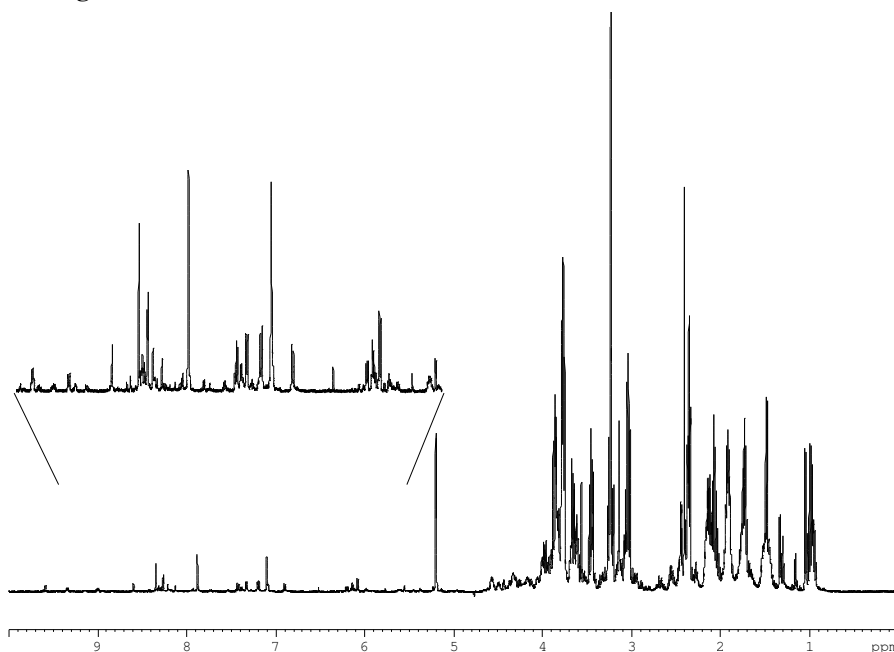


Figura 39 – Espectro 1D ^1H 500 MHz NMR da amostra Controlo pelo método de extracção liofilização com esferas de vidro a seco.

Existem algumas diferenças visíveis entre os dois espectros, mas de uma forma geral apresentam bastantes semelhanças. Numa primeira análise, as diferenças encontram-se nas intensidades dos picos, onde o segundo espectro apresenta alguns sinais com maiores intensidades enquanto que o primeiro espectro apresenta outros. Observaram-se também algumas diferenças entre os desvios químicos de 10.0 a 5.5 ppm, onde o segundo método se torna menos eficiente em relação ao primeiro método. Mas de uma forma geral, um dos métodos favorece uns metabolitos e o outro favorece outros, e como descrito anteriormente, não existe nenhum método que englobe no global a extracção de todos os metabolitos. Através destas observações, confirmou-se que este novo método de extracção a seco é diferente, contudo eficaz na extracção global dos metabolitos em relação ao primeiro método. Mas, ao contrário do método de liofilização, onde os resultados são satisfatórios, com este método a seco não se corre o risco de activação de enzimas quando se adicionou água quente ao liofilizado.

Através da análise por PCA foi possível observar a separação nítida entre os dois métodos, figura 40, demonstrando que existem diferenças entre os dois métodos apresentados e que se obtêm perfis metabólicos diferentes com métodos de extracção distintos.

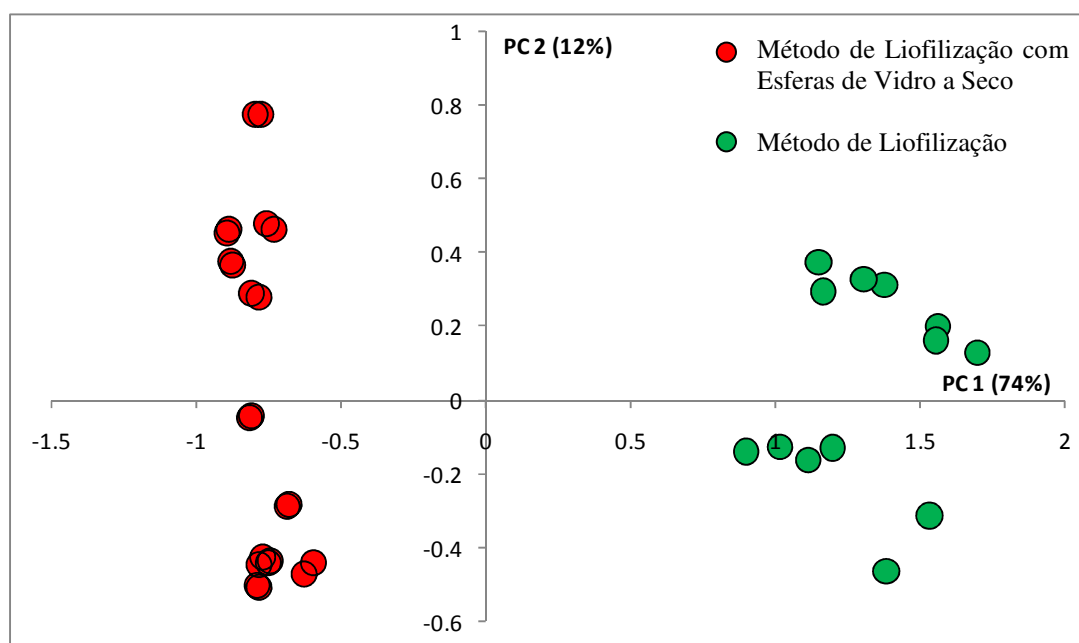


Figura 40 – Gráfico de Scores das amostras Controlo com métodos de extração de metabolitos diferentes.

Métodos de extracção diferentes conduzem a perfis metabólicos diferentes, ou seja, não se poderão comparar perfis quando as amostras são obtidas através de diferentes métodos de extracção.

O gráfico de *scores* contém várias amostras: as células Controlo, crescidas em meio rico e em meio mínimo, para cada um dos métodos utilizados. Ou seja, a cor vermelha representa todas as amostras das células Controlo utilizando o método de liofilização com esferas de vidro a seco, e a cor verde as células Controlo utilizado o método de liofilização.

A separação observada entre os dois métodos utilizados é bastante nítida, onde se obteve 74% de explicação da variabilidade para a primeira componente. De algum modo, esta percentagem torna-se significativa na separação dos dois métodos. A separação é explicada não só pela primeira componente, mas também pela segunda componente, de 12%. Comparando o valor de 12% com os 74% da primeira componente, não se torna tão significativo esse valor, pois a diferença apresentada na segunda componente foi devido à presença das amostras crescidas em meio rico e em meio mínimo e, não ao método de extracção utilizado. A separação entre as amostras deve-se fundamentalmente à trealose. No método de liofilização ao adicionar água quente aos extractos liofilizados faz com que possa existir um stress adicional, ocorrendo a síntese e acumulação da trealose. Consequentemente, a utilização de métodos diferentes de extracção obtêm-se perfis metabólicos distintos e não comparáveis.

Também foi feito o teste de eficiência de extracção para se observar a eficiência do método de liofilização com esferas de vidro a seco. No espectro seguinte, figura 41, representa uma amostra Controlo da fase estacionária onde foi adicionada mais solução tampão ao pellet no final da acção de extracção e filtrada novamente nos centrífugos, de forma a observar se a extracção fora completa.

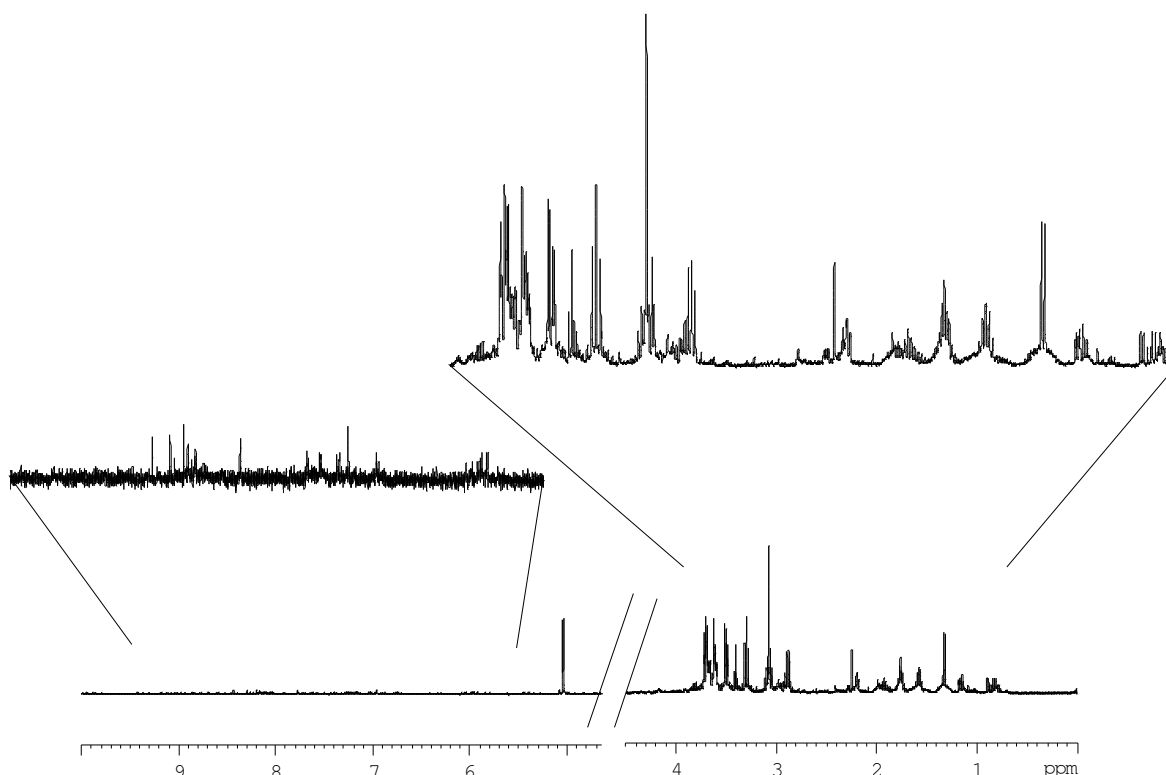


Figura 41 – Espectro 1D ^1H 500 MHz NMR da amostra Controlo da fase estacionária para o segundo momento de extracção, utilizando o método de liofilização com esferas de vidro a seco.

Através desta experiência foi possível observar a eficiência da extracção. De uma maneira geral, para todos os metabolitos em grandes quantidades na amostra, este método não os extrai por completo. No entanto, torna-se eficiente na extracção global de todos os outros metabolitos e preenche os requisitos necessários que se pretendem para um método de extracção. Nomeadamente, assegura o processo *quenching* pois não se adiciona água ao liofilizado e também, através da utilização das esferas de vidro, um maior rendimento pois destrói mais eficientemente as paredes celulares. Contudo, este método não será o mais aconselhado para as análises de quantificação pois, como foi observado, os metabolitos que se apresentam em maiores quantidades não são totalmente extraídos.

Em suma, estes resultados mostram a importância de não se poder utilizar diferentes métodos de extracção de metabolitos para comparar amostras entre células ou de diferentes células transformadas, pois métodos diferentes acarretam perfis metabólicos diferentes. Adicionalmente, o resultado obtido através do método de liofilização com esferas de vidro a seco, permite a obtenção de maiores quantidades de pó ao fim da segunda liofilização e

não corremos o risco em activar qualquer actividade enzimática, pois o processo é feito a seco.

Espectros de NMR e Identificação dos Compostos/Metabolitos nos Extractos de Leveduras

Com o objectivo de comparar os espectros obtidos, foi necessário adquiri-los todos à mesma temperatura, com o mesmo tempo de aquisição, o mesmo ganho no receptor (RG) e com todos os outros parâmetros iguais. É importante manter o mesmo ganho, RG, porque está relacionado com a concentração da amostra (que deverá ser sensivelmente sempre a mesma) e, conseqüentemente, obtêm-se intensidades iguais de sinais para se proceder à comparação dos vários espectros.

A figura 42 mostra os vários espectros 1D ^1H NMR 500 MHz das amostras Controlo de meio rico na fase exponencial e estacionária, G_{33} e T_{33} , depois de estas terem sido reconstituídas por uma solução tampão fosfato contendo D_2O e acertadas a um pH igual a 7.0. As amostras utilizadas na aquisição destes espectros foram obtidas pelo método de extracção liofilização com esferas de vidro a seco e depois de se ter estudado as curvas de crescimento.

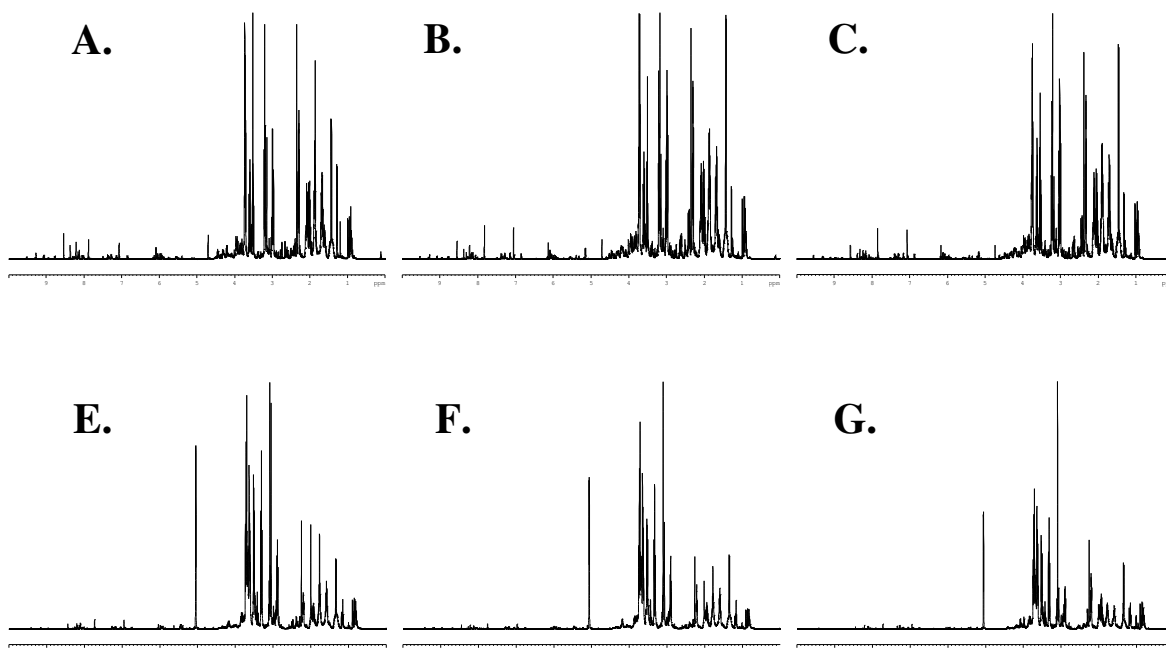


Figura 42 – Espectros 1D ^1H 500 MHz NMR das diferentes células na fase exponencial e estacionária, em meio rico.

Gráficos em cima: Fase exponencial – A. Controlo; B. Células G_{33} ; e C. Células T_{33} . Gráficos em baixo: Fase estacionária – E. Controlo; F. Células G_{33} ; e G. Células T_{33} .

Também as amostras da fase estacionária, utilizadas na aquisição dos espectros, foram obtidas pelo mesmo método de extração que as da fase exponencial. Comparando os três espectros do meio rico de cada fase de crescimento, e concentrando-nos somente no meio rico, observou-se a existência de algumas diferenças entre eles.

Uma das grandes diferenças entre a fase exponencial e estacionária é a presença da trealose em grandes quantidades. Este sinal tem um desvio químico de sensivelmente 5.1 ppm, apresentando-se como um “marcador” da fase estacionária. Enquanto, outras diferenças só se poderão estudar e identificar adquirindo mais espectros 1D para cada uma das células transformadas e realizando a análise por PCA. Contudo, existem diferenças entre as células, bem como ao longo das suas fases de crescimento, obtendo assim para cada uma delas, perfis metabólicos diferentes.

Outra diferença observada entre as duas fases de crescimento foi a quantidade de metabolitos, onde a fase estacionária comparada com a exponencial, apresenta maiores quantidades de metabolitos. Se a massa de extractos em pó é a mesma na preparação de todas as amostras, obtém-se sempre a mesma concentração (m/v) para as duas fases de crescimento, observando-se que os espectros da fase estacionária apresentam menos metabolitos. Consequentemente, o liofilizado da fase estacionária contém maiores quantidades de sais em vez de metabolitos.

Um dos principais objectivos deste trabalho também passou pela identificação dos metabolitos. Consequentemente, e para que fosse mais simples, foi necessário adquirir espectros 2D, pois a partir dos espectros 1D seria difícil identificar os respectivos metabolitos. Deve-se ter em atenção que as liofilizações utilizadas, para a preparação das amostras, fazem com que os únicos metabolitos presentes sejam somente os metabolitos não voláteis, ou seja, todos os outros foram removidos das amostras quando se procedeu à liofilizações.

A identificação dos metabolitos fora iniciada com base dos espectros obtidos pelo método de liofilização (com água). Alguns compostos foram identificados em trabalhos anteriores [49], contudo, neste trabalho teve-se em atenção, identificar maiores quantidades de metabolitos intracelulares através das bases de dados a que se teve acesso. Para tal, adquiriram-se dois espectros diferentes no espectrómetro 800 MHz, no Centro CERMAX ITQB em Lisboa: TOCSY e HSQC.

As figuras 43 e 44 mostram, respectivamente, os espectros TOCSY e a experiência de correlação heteronuclear $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC, apresentando uma alta complexidade das amostras submetidas.

Muitas vezes torna-se complicado identificar os metabolitos nos espectros, ou por não existir nenhum composto identificado nas bases de dados ou então, por ser bastante complexo. Com o intuito de solucionar a complexidade dos espectros, o espectro TOCSY torna-se útil, devido ao facto de apresentar as correlações totais entre prótons, definindo os sistemas de *spins* de cada composto. Este facto torna-se bastante importante para a identificação de novos compostos que, ou estão classificados em outras bases de dados ou então não estão identificados e necessita-se de resolver a estrutura do composto.

O espectro HSQC torna-se bastante útil na atribuição de sinais, ou seja, permite atribuir um tipo de núcleo, ^{13}C , a partir das atribuições conhecidas do outro tipo de núcleo ^1H , relacionando através do acoplamento escalar.

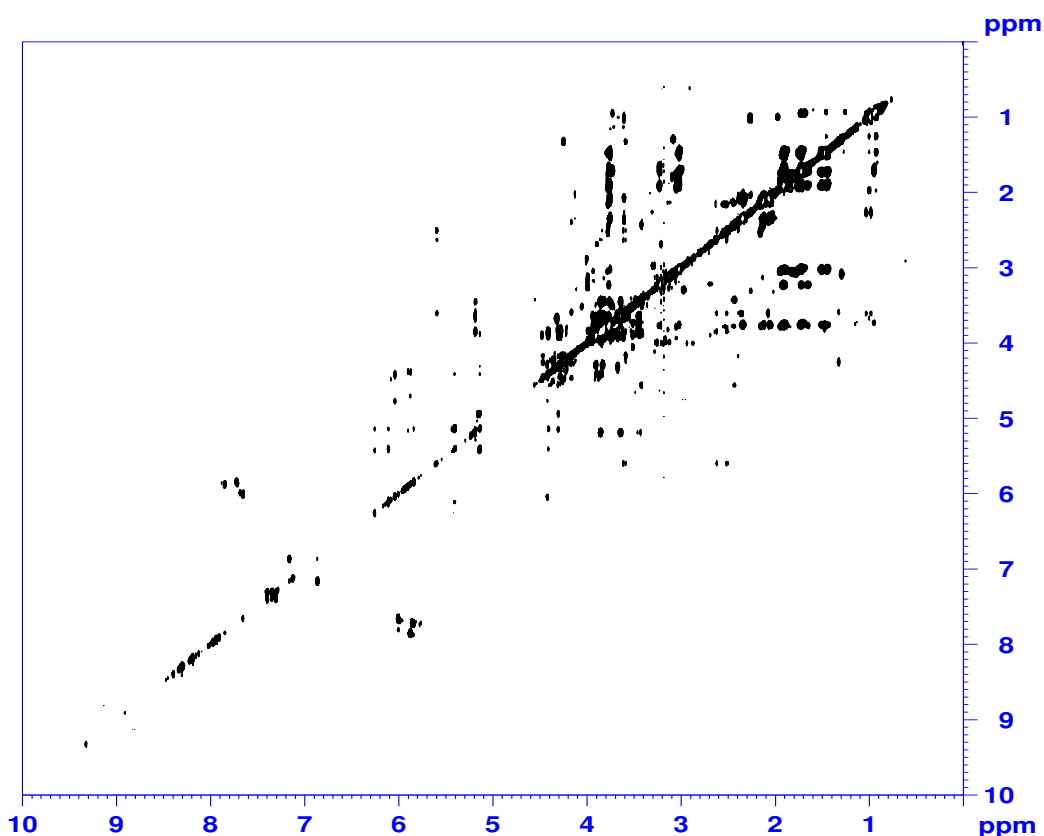


Figura 43 – Espectro TOCSY 800 MHz de uma amostra Controlo em meio rico na fase estacionária.

Espectro TOCSY, adquirido a uma temperatura de 298K, amostra acertada a um pH de 7.0, a sequência de pulsos utilizada “dipsi2esgpph”, com um número de scans igual a 32, tempo de relaxação entre scans de 1.7 segundos, um tempo *mixing* de 60 ms e com 4096 de tamanho de FID e com 512 incrementos para definir a dimensão indirecta.

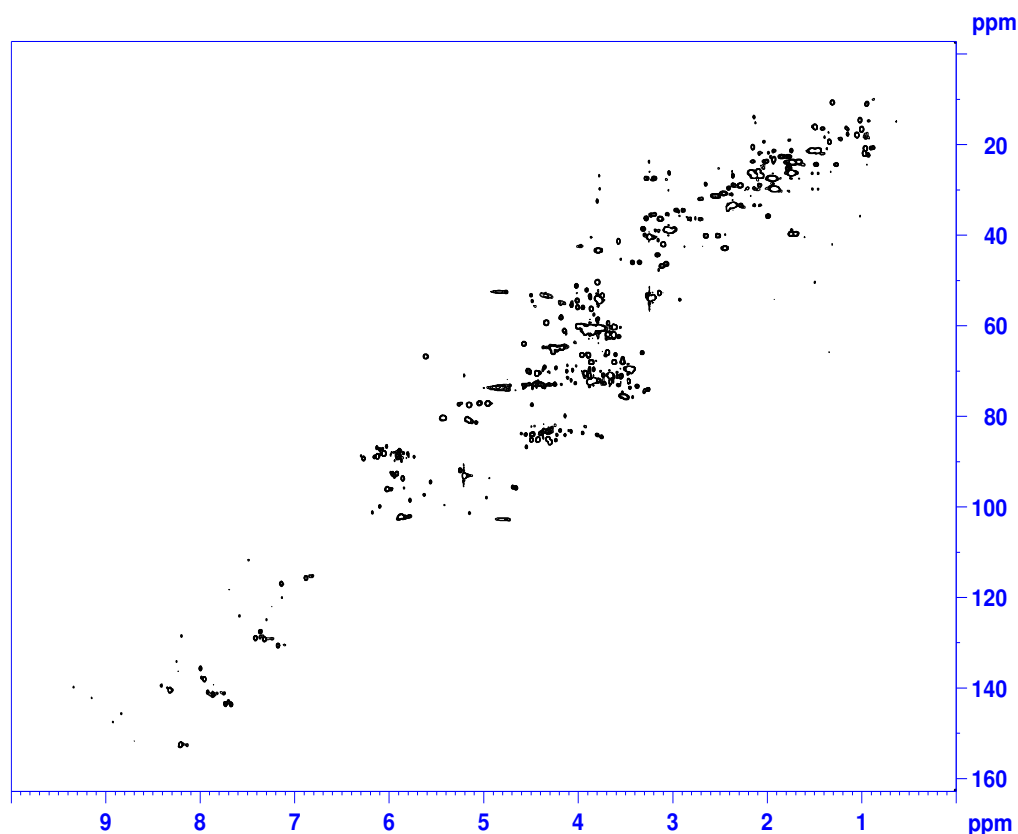


Figura 44 – Espectro de Correlação $^1\text{H} / ^{13}\text{C}$ HSQC 800 MHz NMR de uma amostra Controlo em meio rico na fase estacionária

O espectro HSQC, adquirido a uma temperatura de 298K, amostra acertada a um pH de 7.0, adquiridos por uma sequência de pulsos “hsqcetgpsisp2” com 64 scans, tempo de repetição de 1.5 segundos, 2048 de tamanho do FID com 512 incrementos para definir a dimensão indirecta, usando uma janela espectral de 12820.513 e 33333.50 Hz para o ^1H e ^{13}C , respectivamente.

O espectro mostra-nos um mapa de desvios químicos do ^{13}C em função de desvios químicos do ^1H , cobrindo os dois eixos escalares de 162 ppm e 10 ppm, respectivamente. Devido à semelhança geral dos factores que afectam os desvios químicos destes tipos de núcleos, a maior parte dos pontos de espectro encontram-se perto de uma diagonal.

Neste trabalho a identificação dos metabolitos dividiu-se em duas partes. Observou-se que os acertos dos pH's das amostras tornam-se fundamentais, caso contrário nesta fase da identificação ocorrem variações nos desvios químicos que dificultam a identificação. Com isso, torna-se necessário saber a que pH se encontram as amostras, ou acertar a um determinado valor, para encontrar uma base de dados com esse valor de pH para a identificação, mas também para evitar qualquer alteração no desvio químico. Numa primeira fase, identificaram-se vários compostos listados em anexo pelo artigo [49],

descrito na tabela 4, com base do espectro HSQC e em conjunto com o programa Sparky 3.114, figura 45.

Tabela 4 – Concentração dos metabolitos em mM determinados em extractos de *Saccharomyces cerevisiae* por espectroscopia NMR 2D ^1H - ^{13}C HSQC. [49]

COMPOSTO	Concentração/mM
GABA	3.6
Acetato	SO
Adenosina	0.5
Alanina	26.1
AMP (Adenosina Monofosfato)	0.3
Arginina	43.7
Asparagina	6.9
Aspartato	4.3
Betaina	0.3
Carnitina	0.3
Colina	2.5
Citrato	2.3
Cistina	<1.0
Glicerol	35.5
Glutamina	12.9
Glutathione Reduzida	1.0
Glutathione Oxidada	1.3
Glutamato	96.6
Glicina	28.6
HEPES	5.0
Histidina	16.0
Homoserina	0.5
Isoleucina	6.9
Lactato	SO
Leucina	14.0
Lisina	34.3
Malato	4.9
Metionina	0.3
Myo-Inositol	0.2
Dinucleotido Adenina Nicotinamida	0.8
Ornitine	4.0
Fenilalanine	2.5
Prolina	5.5
Putrescina	SO
Serina	20.0
Sucinato	29.0
THPro	2.7
Treonina	17.0
Trealose	<1.0
Uridina	<1.0
Valina	10.7

SO – indica a sobreposição de sinais

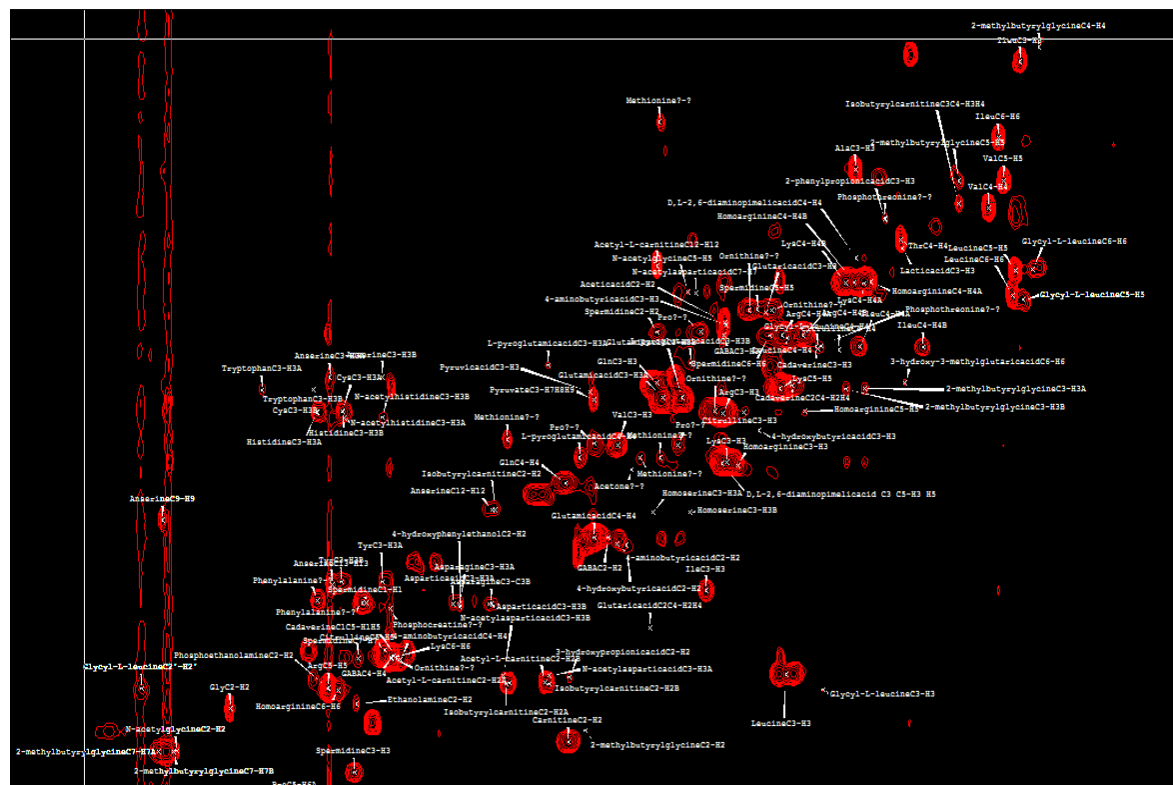


Figura 45 – Alguns sinais identificados no programa Sparky.

Excerto do programa Sparky, espectro HSQC, onde os núcleos apresentados encontram-se situados entre os desvios 10 e 60 ppm para o ^{13}C e 0.70 e 4.2 ppm para o ^1H .

Numa segunda fase da identificação, através do programa AMIX 3.8.4 (Bruker BioSpin, Rheinstetten, Germany) utilizou-se o processo de *matching* onde foi seleccionado um sinal não identificado. Posteriormente, com o sinal seleccionado, foi feita uma procura na base de dados Bruker BioSpin BBiorefcode 2.0.0 ® Base de Dados de Compostos Padrões (Bruker BioSpin, Rheinstetten, Germany). Através desta análise, obteve-se uma listagem de compostos possíveis, com uma determinada probabilidade, que foi posteriormente verificado em seguida na correspondência com todos os sinais do composto espectáveis de serem visíveis no espectro.

Foi ainda utilizada outra base de dados, BMBR [52], que nos forneceu alguma informação para a identificação de outros novos compostos que não estivessem presentes em outras bases de dados anteriormente utilizadas.

A tabela 5 lista 60 compostos/metabolitos identificados a partir dos espectros TOCSY e HSQC. As amostras foram acertadas a um pH sensivelmente igual a 7.0, e

consequentemente todos os metabolitos foram identificados através de bases de dados com este mesmo valor.

Tabela 5 – Listagem dos metabolitos identificados dos extractos das células *Saccharomyces cerevisiae* por espectroscopia

COMPOSTO	δH , ppm (Correspondência) / δC , ppm, [δH a pH 7.0]								
Acetic acid	1.927	C2-H2	26.214						
Acetone	2.237		33.123						
Acetyl-L-carnitine	2.151	C12-H12	23.560	2.643	C2-H2A	43.112	2.524	C2-H2B	43.087
	5.614	C3-H3	69.762	3.862	C4-H4	71.046	3.620	C4-H4A	70.998
	3.211	C6 C7 C8-H6 H7 H8	56.461						
Adenosine	6.056	C1-H1	91.204	8.323	C14-H14	143.512	4.786	C2-H2	76.594
	4.438	C3-H3	73.469	4.297	C4-H4	88.684	8.208	C8-H8	155.529
Adenosine-5-diphosphate	6.130	C1-H1	89.917	8.483	C14-H14	142.739	4.760	C2-H2	77.192
	4.583	C3-H2	72.788	4.387	C4-H4	86.672	4.242	C5-H5	67.759
	8.223	C8-H8	155.765						
Alanine	3.796	C2-H2	53.374	1.492	C3-H3	19.053			
Anserine	2.702	C12-H12	34.995	3.234	C13-H13	38.508	4.502	C2-H2	56.254
	3.241	C3-H3A	28.793	3.066	C3-H3B	28.769	8.311	C6-H6	139.166
	7.137	C8-H8	123.053	3.797	C9-H9	35.494			
Arginine	3.774	C2-H2	57.365	1.933	C3-H3	30.492	1.735	C4-H4A	26.808
	1.665	C4-H4B	26.808	3.245	C5-H5	43.337			
Asparagine	4.018	C2-H2	54.183	2.810	C3-H3	39.413	2.830	C3-H3A	39.413
	2.712	C3-H3B	39.413						
Betaine	3.890	C2-H2	69.457	3.274	C4 C4 C5 C6-H4 H5 H6	56.356			
Cadaverine	3.018	C1 C5-H1 H5	41.911	1.704	C2 C4-H2 H4	29.183	1.622	C3-H3	27.333
Carnitine	2.447	C2-H2	45.876	4.573	C3-H3	66.977	3.464	C4-H4	72.569
	3.238	C6 C7 C8-H6 H7 H8	56.933						
Choline	4.069	C1-H1	58.506	3.527	C2-H2	70.329	3.204	C4-H4	56.741
Cystine	4.005	C2-H2	58.900	3.200	C3-H3A	30.374	3.281	C3-H3B	30.421
D-glucose	5.250	C1 α -H1	95.800	4.658	C1 β -H1	98.836	3.559	C2 α -H2	74.293
	3.259	C2 C4 β -H2	77.550	3.727	C3 α -H3	75.674	3.495	C3 C4 β -H3 H4	78.703
	3.836	C4 α -H4	73.978	3.437	C5 α -H5	72.743	3.836	C6 α - H6A	63.392
	3.758	C6 α -H6	63.500	3.907	C6 β -H6B	63.565			
Ethanolamine	3.836	C1-H1	60.519	3.152	C2-H2	44.111			
Ethyleneglycol	3.669	C1 C2-H1 H2	65.353						
GABA	2.315	C2-H2	36.314	1.930	C3-H3	26.822	3.030	C4-H4	41.838
Glutamine	3.792	C2-H2	57.018	2.153	C3-H3	29.060	2.457	C4-H4	33.760
Glutamic acid	3.762	C2-H2	57.430	2.133	C3-H3A	29.738	2.068	C3-H3B	29.738
	2.361	C4-H4	36.304						
Glutaric acid	2.175	C2 C4-H2 H4	40.519	1.791	C3-H3	25.740			
Glycine	3.573	C2-H2	44.299						
Glycerol	3.657	C1 C3-H1A H3A	65.353	3.571	C1 C3-H1B H3B	65.377	3.787	C2-H2	75.044
Glycerophosphocholine	4.335	C1-H1	62.373	3.681	C1-H1A	64.965	3.624	C1-H1B	64.965
	3.687	C2-H2	68.793	3.924	C2-H2	73.518	3.884	C3-H3A	69.423
	3.961	C3-H3B	69.448	3.242	C4 C5 C6- H4 H5 H6	56.577			
Glycolic acid	3.936	C2-H2	64.069						
Histidine	4.010	C2-H2	57.438	3.284	C3-H3A	30.424	3.198	C3-H3B	30.400
	7.140	C5-H8	120.058	7.998	C7-H7	138.652			
Homoarginine	3.750	C2-H2	57.487	1.884	C3-H3	32.931	1.439	C4-H4A	24.316

COMPOSTO	δH, ppm (Correspondência) / δC, ppm, [δH a pH 7.0]								
	1.496	C4-H4B	24.340	1.660	C5-H5	30.376	3.213	C6-H6	43.445
Homoserine	3.855	C2-H2	56.197	2.166	C3-H3A	35.097	2.043	C3-H3B	35.097
	3.793	C4-H4	61.624						
Isoleucine	3.683	C2-H2	62.413	1.988	C3-H3	38.769	1.478	C4-H4A	27.348
	1.267	C4-H4B	27.362	0.944	C5-H5	13.994	1.016	C6-H6	17.568
L-pyroglutamicacid	2.514	C3-H3A	28.222	2.041	C3-H3B	28.107			
	2.410	C4-H4	32.553						
Lactic acid	4.115	C2-H2	71.736	1.336	C3-H3	22.747			
Leucine	3.748	C2-H2	56.254	1.722	C3-H3	42.711	1.719	C4-H4	26.939
	0.960	C5-H5	23.765	0.969	C6-H6	24.952			
Lysine	3.768	C2-H2	57.463	1.920	C3-H3	32.785	1.464	C4-H4A	24.389
	1.525	C4-H4B	24.364	1.742	C5-H5	29.305	3.037	C6-H6	41.960
Methionine	3.873		56.684	2.144		16.820	2.209		32.542
	2.650		31.690	2.141		32.542			
Myo-Inositol	3.290		77.200	4.077		75.068	3.627		75.335
	3.546		74.123						
Niacinamide	8.232		139.320	7.586		127.085	8.699		154.753
	8.924		150.562						
Nicotinic acid	8.941	C2-H2	151.919	8.249	C4-H4	140.580	7.514	C5-H5	126.867
	8.603	C6-H6	153.324						
Ornithine	1.771		25.643	3.792		56.970	3.037		41.925
	1.845		25.643	1.959		30.392			
Phenylalanine	7.419		132.034	3.282		39.259	3.997		58.894
	7.366		130.590	7.320		132.215	3.131		39.356
Phosphocreatine	3.934		56.544	3.041		39.624			
Phosphoethanolamine	4.000	C1-H1	63.127	3.248	C2-H2	43.379			
Phosphothreonine	4.373		72.649	1.606		27.309	1.393		21.322
Proline	2.006		26.646	2.361		31.882	2.082		31.972
	4.144	C2-H2	64.071	3.430	C5-H5A	48.988	3.357	C5-H6A	48.898
Pyruvate	2.363	C3-H7 H8 H9	29.846						
Serine	3.861	C2-H2	59.231	3.998	C3-H3A	63.068	3.966	C3-H3B	63.055
Threonine	1.341		22.346	4.267		68.772	3.620		63.234
Trehalose	3.660		73.939	3.872		75.412	3.863		63.409
	3.779		63.409	3.832		75.068	5.202		96.125
	3.463		72.540						
Tyrosine	3.949	C2-H2	58.941	3.066	C3-H3A	38.382	3.203	C3-H3B	38.389
	7.178	C5 C9-H5 H9	133.658	6.883	C6 C8-H6 H8	118.766			
Uridine	7.864	C11-H25	144.519	5.874	C12-H26	105.131	4.139	C4-H19	87.197
	4.235	C5-H20	72.305	4.357	C6-H21	76.405	5.913	C7-H22	91.998
	3.920	C9-H23	63.844	3.824	C9-H24	63.844			
Valine	3.622	C2-H2	63.247	2.283	C3-H3	31.981	1.049	C4-H4	20.851
	0.998	C5-H5	19.562						
2-methylbutyrylglycine	2.392	C2-H2	45.343	1.461	C3-H3A	29.305	1.525	C3-H3B	29.329
	0.881	C4-H4	13.315	1.147	C5-H5	19.594	3.812	C7-H7A	46.316
	3.761	C7-H7B	46.316						
D,L-2,6-diaminopimelic acid	1.935	C3 C5-H3 H5	32.815	3.773	C2 C6-H2 H6	57.450	1.49	C4-H4	23.189
4-hydroxybutyric acid	2.254	C2-H2	36.644	1.812	C3-H3	31.290	3.62	C4-H4	64.691
3-hydroxy-3-methylglutaric acid	2.424	C2 C4-H2A H4A	51.519	2.461		51.519	1.329	C6-H6	29.060

A figura 46 apresenta um espectro 1D 1H com alguns respectivos metabolitos identificados. Sem ajuda dos espectros 2D, confirma-se que se torna difícil identificar os respectivos compostos somente a partir dos espectros 1D.

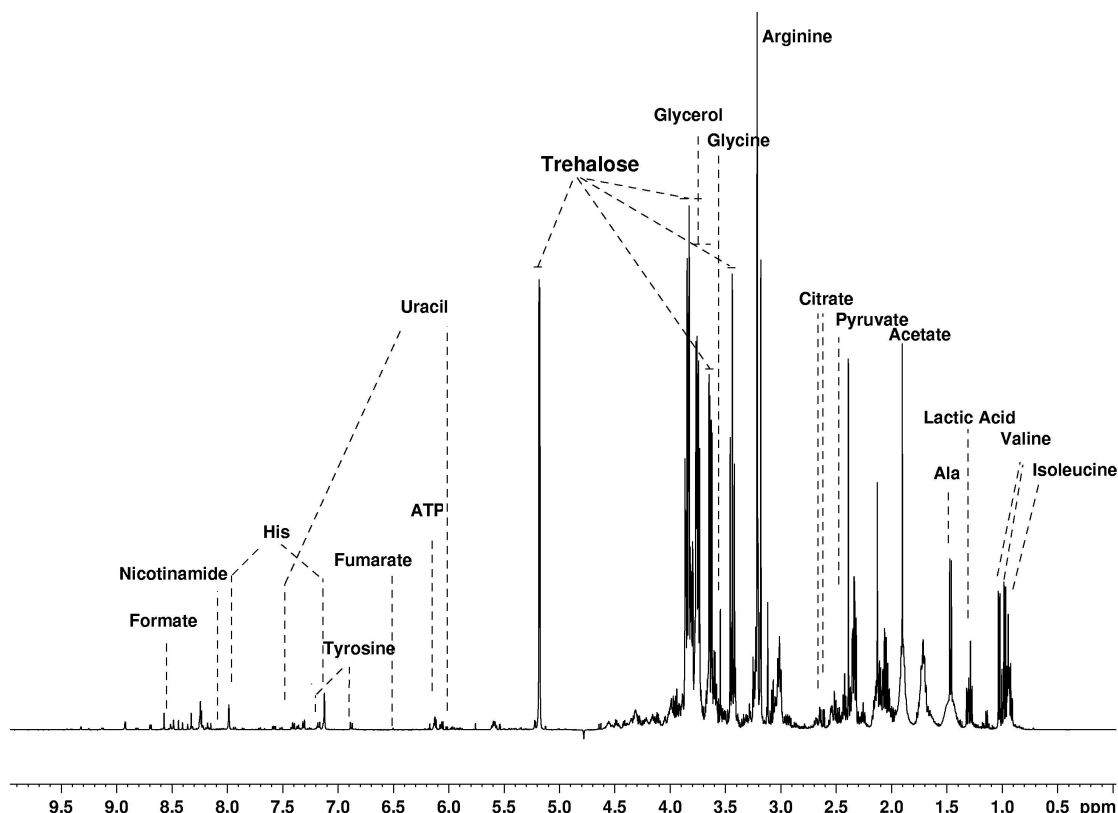


Figura 46 – Espectro 1D ^1H 500 MHz de uma amostra Controlo meio rico da fase estacionária com alguns metabolitos identificados.

Não apresentando mais correspondência entre os núcleos não identificados com a base de dados utilizada, recorreu-se à determinação dos sistemas de *spins* que apresentavam correlação entre si no espectro TOCSY.

Identificaram-se cerca de 40 sistemas de *spins* não identificados, tabela 6, que demonstram, por um lado, o potencial da espectroscopia de ressonância magnética nuclear para a identificação de compostos, como também a necessidade de complementar esta técnica com outras, como a cromatografia líquida associada à ressonância magnética nuclear ou mesmo a utilização da espectrometria de massa de forma a complementar esta identificação.

Tabela 6 – Listagem dos sistemas de *spins* identificados a partir do espectro TOCSY

Sistema de <i>Spin</i>	δ 1H em ppm/ δ 1H em ppm, [δ 1H em ppm a pH 7.0]
1	9.152 / 8.845 / 9.343 / 8.842 / 9.152 / 9.159 / 8.849 / 9.345 / 9.354 / 9.155
2	7.786 / 7.787
3	8.009 / 8.012
4	8.305 / 8.315
5	7.336 / 7.355
6	7.280 / 7.295
7	7.208 / 7.211
8	6.876 / 6.884 / 6.885 / 7.183
9	7.532 / 7.537
10	6.236 / 6.237
11	6.154 / 6.162
12	7.680 / 7.677 / 6.024 / 7.675 / 6.026 / 6.023
13	5.842 / 5.847
14	5.472 / 5.473
15	3.663 / 3.875 / 3.868 / 3.876 / 3.663 / 3.669 / 5.209 / 5.207 / 3.869 / 5.207 / 3.662 / 5.207
16	4.604 / 4.605
17	4.823 / 4.824
18	4.744 / 4.745
19	4.362 / 4.373
20	4.548 / 4.549
21	4.653 / 4.656
22	4.466 / 4.481
23	4.434 / 4.441
24	4.291 / 4.289
25	4.127 / 4.128
26	4.243 / 4.246
27	4.517 / 4.518
28	4.194 / 4.195
29	5.079 / 5.102
30	3.789 / 3.790
31	3.583 / 3.586
32	3.506 / 3.509
33	3.629 / 3.634
34	3.430 / 3.435
35	7.146 / 7.144 / 7.146 / 7.995 / 7.993 / 7.994
36	0.947 / 0.949
37	1.368 / 1.370
38	1.932 / 3.037 / 3.036 / 3.042 / 1.494 / 1.918 / 1.748 / 3.042 / 1.928 / 1.918 / 1.744 / 1.743 / 1.493 / 1.471 / 1.494 / 3.042 / 1.493 / 1.741 / 1.748 / 1.919
39	5.899 / 5.894 / 7.868 / 5.894 / 5.899 / 7.869 / 7.868 / 7.869
40	5.430 / 5.424 / 5.151 / 5.424 / 5.151 / 5.155

Os metabolitos identificados foram analisados e comparados com bases de dados existentes do metabolismo das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* [54]. Através desta análise, comprovou-se que este método de extracção, método de liofilização, para além de apresentar dúvidas em alguns passos do procedimento como descrito anteriormente, extrai bastantes compostos que poderão não pertencer ao metabolismo das *Saccharomyces cerevisiae*, como por exemplo etilenoglicol e acido-4-hidroxibutírico.

Este método de extracção ao ser alterado, resultou na obtenção de espectros diferentes que apresentam menores quantidades de metabolitos extraídos. Em seguida, apresentam-se dois espectros HSQC, figura 47, das duas técnicas de extracção e observou-se que a técnica de extracção liofilização com esferas de vidro a seco, o espectro do lado direito, extrai menos metabolitos em relação à técnica de liofilização apresentando menos sinais em relação ao espectro do lado esquerdo.

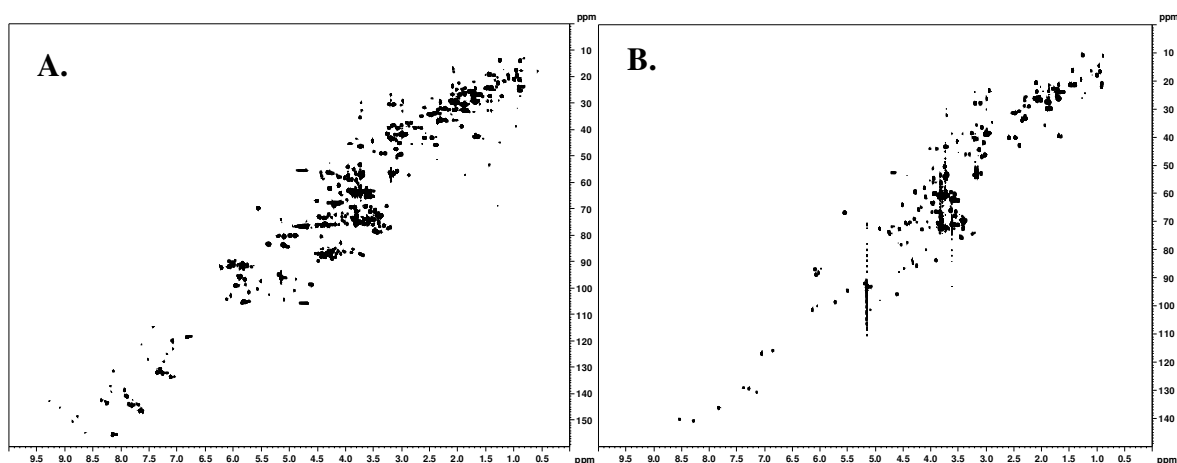


Figura 47 – Espectros de Correlação $^1\text{H} / ^{13}\text{C}$ HSQC 800 MHz NMR das amostras Controlo em meio rico na fase estacionária utilizando técnicas diferentes de extracção dos metabolitos. A) Método de Liofilização. B) Método de Liofilização com Esferas de Vidro a Seco.

Os espectros HSQC, adquiridos a uma temperatura de 298K, amostra acertada a um pH de 7.0, adquiridos por uma sequência de pulsos “hsqcetgpsisp2” com 64 scans, tempo de repetição de 1.5 segundos, 2048 de tamanho do FID com 512 incrementos para definir a dimensão indirecta, usando uma janela espectral de 12820.513 e 33333.50 Hz para o ^1H e ^{13}C , respectivamente.

Inicialmente as amostras foram preparadas com uma referência interna trimetilsililpropionato, TSP. Contudo, o TSP tem um pKa perto de 5.0 fazendo com que os desvios químicos sejam mais dependentes do pH. Esta condição pode ser claramente observada na zona compreendida 9.0-6.0 ppm existindo uma certa dificuldade na

identificação de compostos nessa zona, pois é variável. Para além do pH, existem outros factores que influenciam os desvios químicos, como a força iónica [4].

Com estas dificuldades de identificação dos metabolitos, deixou-se de preparar as amostras com uma referência interna e optou-se somente pela calibração dos espectros, através do sinal do grupo metilo da alanina.

Análise Quimiométrica – PCA – Cuidados a ter

Muitas vezes, o estudo e interpretação dos resultados obtidos envolvem a análise de uma infinidade de variáveis, constituindo desta forma um trabalho que, além de complicado e demorado, é susceptível a interpretações erradas e a perdas de informações relevantes. Desta forma, a utilização de ferramentas matemáticas e estatísticas como análise de componentes principais, PCA, destaca-se como uma importante ferramenta para o tratamento de um grande número de dados.

A análise quimiométrica não supervisionada, PCA, foi aplicada aos espectros das várias amostras obtidos no espectrómetro 500 MHz. A análise foi realizada no programa AMIX 3.8.4 (Bruker BioSpin, Rheinstetten, Germany) e o resultado obtido para cada uma das análises, e os mais importantes, foram dois gráficos: um dos *scores* e outro dos *loadings* (figura 48).

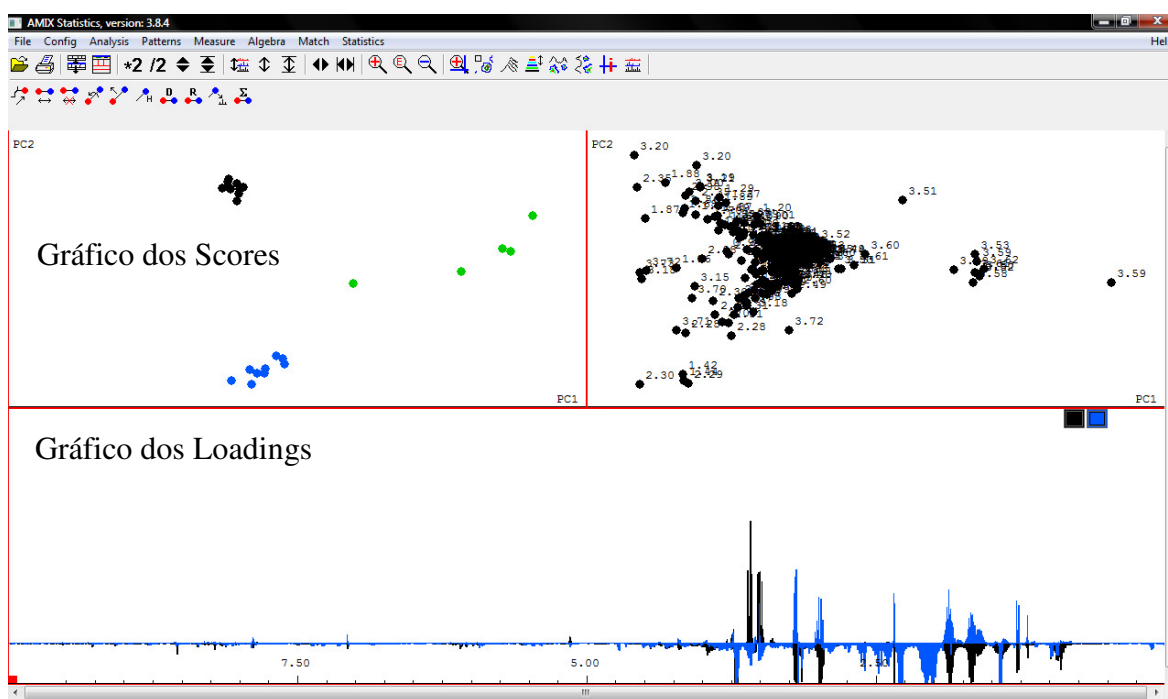


Figura 48 – Resultado obtido na análise por PCA no programa Amix 3.8.4 (Bruker BioSpin, Rheinstetten, Germany)

O resultado da análise por PCA são dois gráficos: scores e loadings. Os scores fornecem a informação da relação entre amostras e os loadings a correlação entre variáveis.

Cada ponto no gráfico de *scores* do PCA representa todos os dados contidos num só espectro. Um conjunto de pontos que se aglomeram na mesma região possuem espectros mais similares (logo, maior similaridade bioquímica), do que um conjunto de pontos que se aglomeram mais separadamente. Os gráficos de PCA são extremamente poderosos na identificação rápida de conjuntos de dados. No entanto, os gráficos das *scores* pouco ajudam na identificação dos biomarcadores, não permitindo uma melhor compreensão a nível molecular, não acrescentando nada acerca do significado do que necessitamos de saber do conjunto de dados. Ainda assim, os dados de PCA podem ser examinados em detalhe de forma a estabelecer as relações entre as variáveis responsáveis pelos *loadings*. Após a identificação das variáveis, que são as principais responsáveis pela separação, as regiões espectrais podem ser identificadas e as moléculas específicas podem ser postuladas.

Antes de se passar à análise foi necessário calibrar os espectros. Este passo torna-se bastante importante, pois não o fazendo corre-se o risco de comprometer todos os resultados. Em primeiro lugar, deve-se utilizar uma referência de um desvio químico, ou seja, acertar todos os espectros, tendo esse sinal com o mesmo desvio químico. Neste estudo utilizou-se a calibração pelo sinal da alanina em todos os espectros. Contudo, o mais correcto será a utilização de açúcares no acerto, pois os açúcares variam menos com o pH. Em segundo lugar deve-se acertar a fase. Este passo também se torna bastante importante, pois uma ineficiente correcção da fase pode acarretar integrações imprecisas. Finalmente, deve-se definir a linha de base. Uma correcção pobre da linha de base pode levar a que determinados picos sejam menos intensos que o valor mínimo da linha de base, o que levará a uma integração pouco precisa dos picos.

Assim sendo, o primeiro passo efectuado foi definir o intervalo dos desvios químicos e aqueles a excluir. Os intervalos definidos no PCA foram compreendidos entre 10 e 0 ppm, com uma zona de exclusão entre 4.725 e 4.675 ppm, sendo essa a zona da água.

As amostras de biofluidos são bastante complexas e os desvios químicos são fortemente dependentes dos pH's. Quando o pH não é acertado a um valor estipulado, ocorrerá uma grande variação dos desvios, tornando-se difícil a identificação de alguns compostos. Ou seja, torna-se bastante importante o acerto do pH, tanto para que não existam variações nos desvios, mas também para que seja possível identificar os metabolitos presentes através de

bases dados existentes. Em determinadas amostras, o “problema” do pH não se resolve por completo e ter-se-á que recorrer a outros meios de forma a evitar grandes variações. Por exemplo, a histidina apresenta-se como um metabolito que varia bastante com o pH, ou seja, mesmo acertando as amostras a um determinado pH, os desvios químicos variam bastante. A solução está na definição dos intervalos dos *buckets*, ou seja, quando existem grandes variações de desvios químicos poder-se-ão criar *buckets* manualmente. Este processo faz com que num intervalo onde existam mais do que um pico, e estes estejam desviados, figura 49, sejam definidos somente como um sinal.

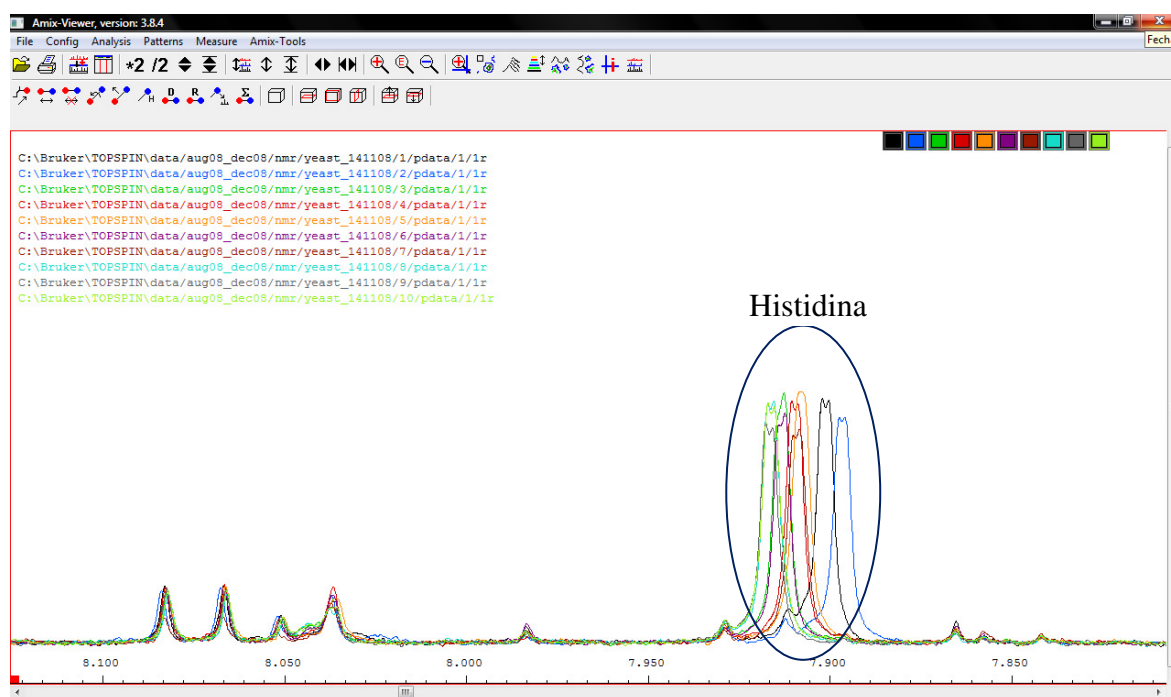


Figura 49 – Variações dos desvios químicos devido ao pH.

Espectros 500 MHz ^1H 1D das amostras Controlo. Zona compreendida entre 7.8 e 8.2 ppm. Sensivelmente a 7.9 ppm encontra-se a histidina, um dos metabolitos mais sensível ao pH.

Trabalho Futuro – Perfis Metabólicos

Este trabalho, como referido anteriormente, teve como objectivo estudar e encontrar um método eficiente na extracção global dos metabolitos para que posteriormente fosse possível analisar o metabolismo das várias células transformadas com os respectivos plasmídeos, contendo erros de tradução, e compará-los de forma a identificar biomarcadores.

De uma forma muito simples e através dos espectros 2D HSQC 800 MHz obtidos no CERMEX, verificou-se através da sobreposição dos respectivos espectros, a existência de diferenças metabólicas entre as diferentes células, ou seja, existiam diferenças nos metabolitos e nas intensidades entre eles. Foram adquiridos espectros tanto na fase exponencial como na fase estacionária, figuras 50 e 51, respectivamente, de forma a comparar as células transformadas nas diferentes fases.

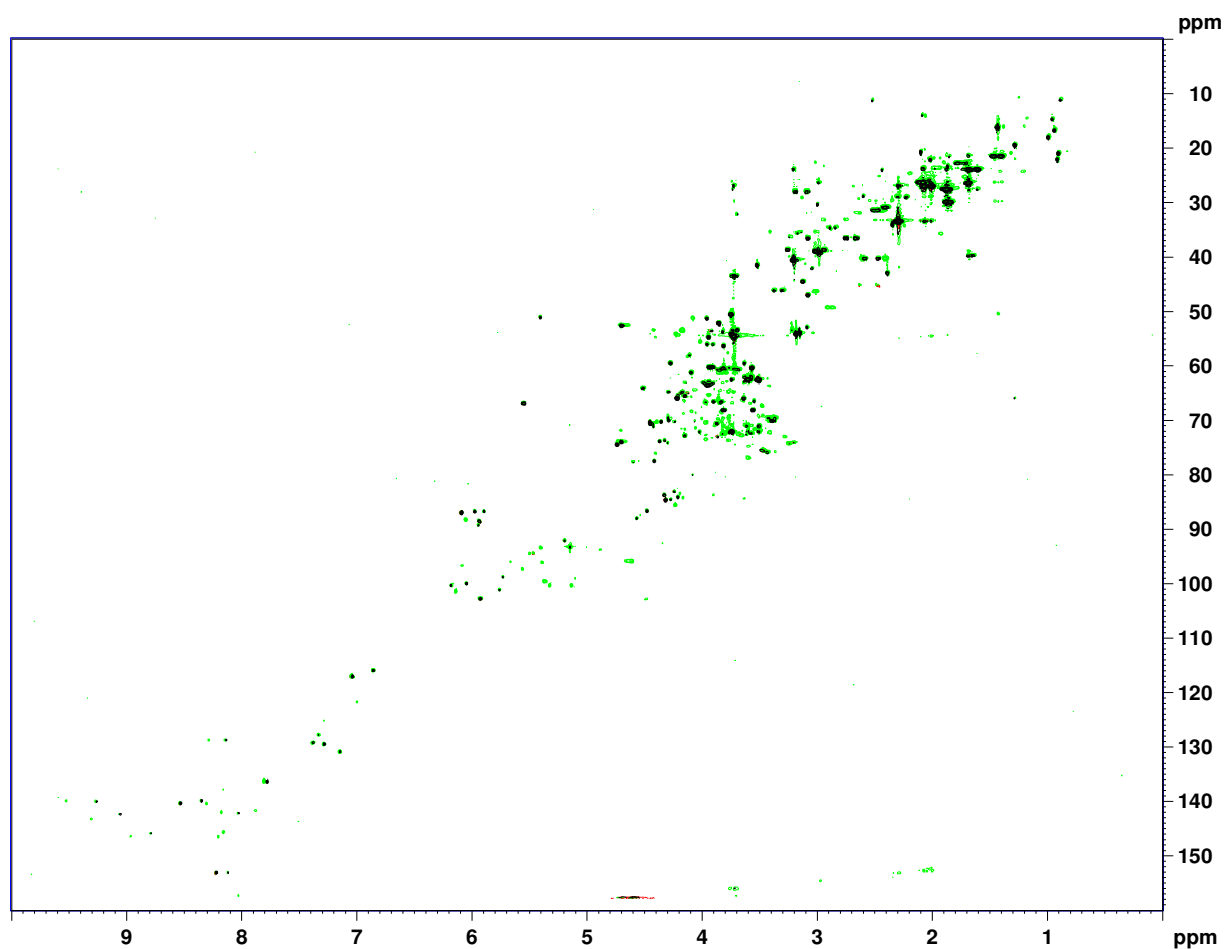


Figura 50 – Espectros sobrepostos 2D HSQC 800 MHz da fase exponencial das células Controlo, G₃₃ e T₃₃.

O espectro das células Controlo apresenta-se de cor preta, as células G₃₃ a cor vermelha e do T₃₃ a cor verde.

Com base nos gráficos apresentados, verificou-se que a análise dos três conjuntos de células nas duas fases de crescimento é bastante complexa, pela simples observação da sobreposição dos espectros. Numa primeira análise, observou-se que existem de facto diferenças metabólicas nas células, tanto na fase exponencial como na fase estacionária.

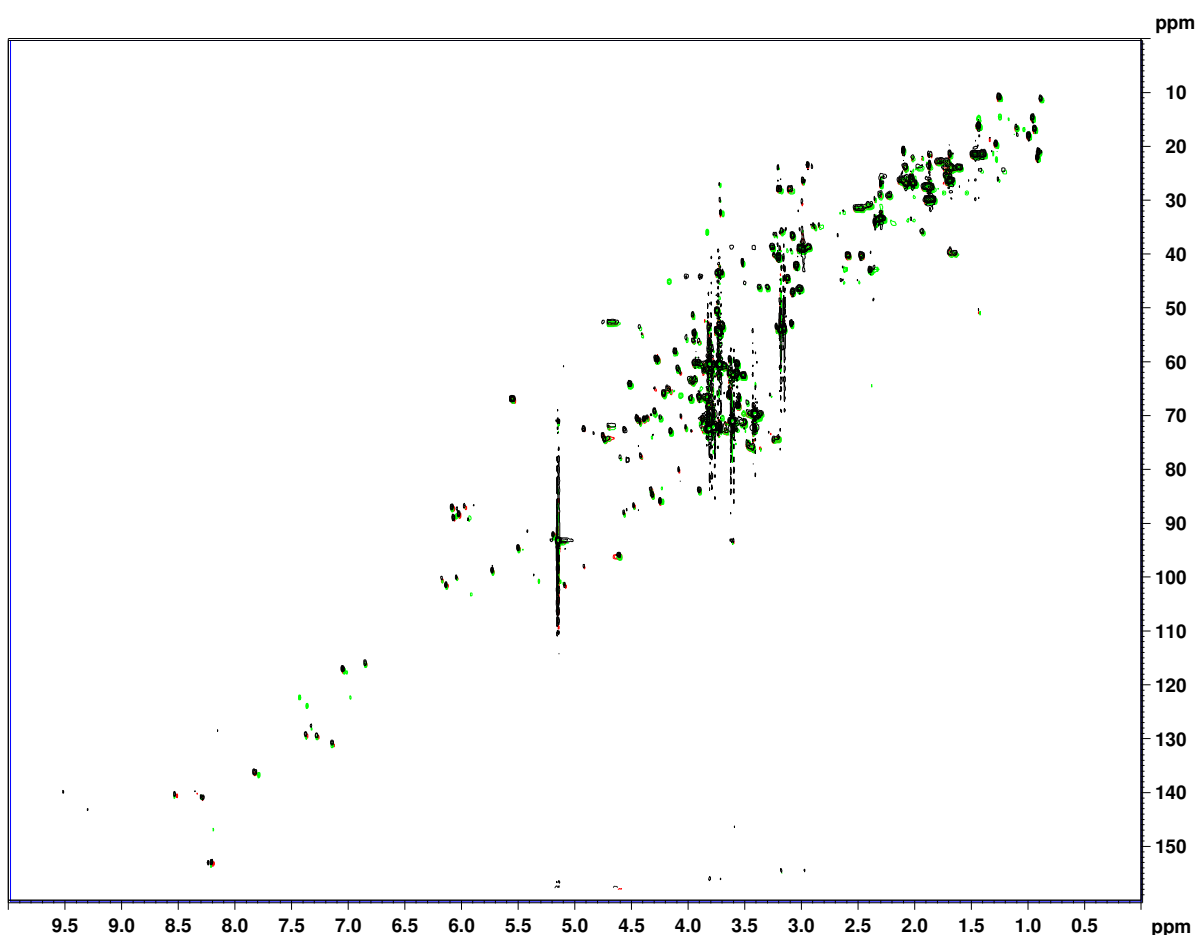


Figura 51 – Espectros sobrepostos 2D HSQC 800 MHz da fase estacionária das células Controlo, G₃₃ e T₃₃.

O espectro das células Controlo apresenta-se de cor preta, células G₃₃ a cor vermelha e do T₃₃ a cor verde.

Através do método experimental otimizado e pelos primeiros resultados obtidos irão ser identificadas as diferenças que existem para as células contendo os diferentes plasmídeos, nas duas fases de crescimento, e entendê-las ao nível bioquímico. Mas também estudar os metabolismos dos três conjuntos de células quando existem outros factores de stress acumulados, como por exemplo o aumento da temperatura. Em paralelo, pretende-se

também, identificar o maior número de metabolitos possível, recorrendo a outras técnicas de análise, para que se obtenha um perfil metabólico mais completo para as células *Saccharomyces cerevisiae*.

Capítulo IV.

Conclusão

Os procedimentos para a obtenção das amostras para estudos metabonómicos por NMR diferem com a natureza das mesmas. Quando os estudos incidem em extractos celulares, estes procedimentos devem ser estudados de forma a que exista menor variabilidade possível entre réplicas de amostras e que o método utilizado seja reproduzível, simples e rápido.

Este estudo focou-se na optimização do procedimento experimental, nos crescimentos celulares das leveduras *S. cerevisiae* e na extracção dos metabolitos intracelulares. Torna-se fundamental para a obtenção do perfil metabólico de extractos celulares, o estudo de determinados parâmetros/factores durante o procedimento de obtenção das amostras: os meios de crescimento; as células transformadas com os respectivos plasmídeos; as curvas de crescimento das respectivas células transformadas; e o método de extracção mais eficiente, de forma a que se tenham resultados fiáveis e reproduzíveis.

Com o intuito de adquirir os espectros por NMR para a análise metabonómica de extractos, deve-se fazer crescer as células para posteriormente se extrair os metabolitos. O primeiro cuidado reside nas placas de Petri, devendo-se ter sempre placas novas de Agar e células frescas. Caso contrário, não se poderão utilizar as amostras resultantes para posterior análise. O segundo factor a ter em conta foi a composição dos meios, devendo-se ter a preocupação de preparar os meios com a mesma composição. A preparação deverá ser feita nas mesmas condições, uma vez que poderão existir diferenças nos crescimentos para as mesmas células. Através dos estudos das composições dos meios concluiu-se que, existindo diferenças nos meios, os mesmos influenciarão os crescimentos e, consequentemente, o metabolismo, obtendo-se perfis metabólicos diferentes.

Os pré-inóculos são fundamentais para os crescimentos e confirmou-se que, se estes não atingirem a fase estacionária, ao transferir para o inóculo o número de células necessárias para começar o crescimento a uma determinada OD, as células poderão não se apresentar na mesma fase de crescimento. Esta diferença poderá acarretar diferenças de metabolismo para a mesma amostra. Ou seja, as células como se apresentam em diferentes fases de crescimento, e sabendo que o metabolismo varia em cada fase, nestas condições obter-se-ão perfis errados para as mesmas células transformadas de diferentes fases.

Para além destes factores, e de forma a diminuir a variabilidade entre amostras, foram também estudadas as curvas de crescimento das células com os respectivos plasmídeos. Este estudo foi fundamental, ficando-se a conhecer o tempo necessário de crescimento para cada conjunto de células transformadas até estas atingirem as diferentes fases de crescimento exponencial e estacionária. Assim, durante a recolha das células, obteve-se sensivelmente a mesma OD e, consequentemente, o mesmo número de células para cada cultura. Este parâmetro torna-se importante na análise por PCA, pois obtendo o mesmo número de células, obtêm-se as mesmas quantidades globais de metabolitos para cada conjunto de células.

Confirmou-se também que, ao longo do crescimento das células, o metabolismo varia. No fim da fase exponencial, o pH diminui até estabilizar, denominando-se essa zona por “*Diauxic Shift*”, onde as células deixam o processo anaeróbico e passam para o aeróbico. Esta mudança torna-se bastante útil para a recolha das células, pois sabendo-se o tempo em que se dá esta mudança de pH, poder-se-á estimar um pouco antes dessa zona a altura da recolha das células na fase exponencial. No caso da fase estacionária, deixou-se que o pH se estabiliza e verificou-se onde apresentava a maior OD, para obter o maior número de células. Desta modo, e de forma a recolhermos as células na fase exponencial, as células Controlo e G₃₃ necessitam de 6 horas de crescimento, e as células T₃₃ de 13 horas. Ainda para o caso da fase estacionária, as células Controlo e G₃₃ necessitam de 20 horas, enquanto que as T₃₃ de 33 horas.

Também foram testados três métodos de extracção dos metabolitos e concluiu-se que o método utilizado é importante. Se este não for bem sucedido, a extracção poderá comprometer todo o resto do estudo metabonómico. O primeiro método, extracção através das esferas de vidro mais etanol, foi logo excluído pois não existia eficiência na obtenção das amostras em pó, ao fim da liofilização. Em seguida, foi testado o método de liofilização e, neste caso, de forma a evitar a activação das enzimas e alteração das amostras, mas mantendo um rendimento maior na obtenção das amostras em pó, alterou-se o procedimento em alguns passos. Assim, ao fim da primeira liofilização, em vez da água quente utilizaram-se esferas de vidro a seco para a destruição das paredes celulares das células. Através destas alterações observou-se que o número de metabolitos extraídos foi menor quando comparado com o número de metabolitos extraídos utilizando o método de liofilização. Conclui-se, que a primeira técnica com água quente extrai bastantes

compostos, mas alguns deles poderão não fazer parte do metabolismo das leveduras. Enquanto o método de liofilização com esferas de vidro a seco extraem-se menos metabolitos mas, em contrapartida, e pelo conhecimento prévio das vias metabólicas das leveduras estudadas, os mesmos pertencem ao metabolismo das *Saccharomyces cerevisiae*.

Neste caso, e comparando os dois métodos com água e a seco mais esferas de vidro, os resultados obtidos são distintos, apresentando perfis metabólicos diferentes. Também se comprovou que dos dois métodos estudados, não existe nenhum 100% eficiente na extracção global de todos os metabolitos intracelulares.

Concluiu-se também que com este estudo, futuramente terão de ser desenvolvidos e testados novos métodos de extracção de metabolitos intracelulares, de forma a favorecer na globalidade a extracção de todos os metabolitos, para a obtenção de um perfil metabólico completo.

Por último, o objectivo deste trabalho também passou pela identificação do maior número possível de compostos novos, a partir dos espectros de NMR adquiridos. Pela análise dos espectros obtidos a 800 MHz, conseguiu-se identificar cerca de 60 metabolitos. Verifica-se assim que futuramente terá de se recorrer a técnicas de ressonância magnética nuclear hifenadas, como a cromatografia líquida, como também à espectrometria de massa, de forma a se obter um perfil metabólico correcto e completo.

Bibliografia.

1. Nangle, L.A., et al., *Global effects of mistranslation from an editing defect in mammalian cells*. Chem Biol, 2006. **13**(10): p. 1091-100.
2. Silva, R., et al., *The Yeast PNC1 Longevity Gene Is Up-Regulated by mRNA Mistranslation*. 2009. **4**(4).
3. Graca, G., et al., *Potential of NMR Spectroscopy for the study of human amniotic fluid*. Analytical Chemistry, 2007. **79**(21): p. 8367-8375.
4. Lane, A.N. and T.W.-M. Fan, *Structure-based profiling of metabolites and isotopomers by NMR*. Elsevier, 2008. **52**: p. 69-117.
5. Teahan, O., et al., *Impact of analytical bias in metabonomic studies of human blood serum and plasma*. Analytical Chemistry, 2006. **78**(13): p. 4307-4318.
6. Gombert, A.K. and S.G.V. Boas, *Análise Metaboloma*. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, 2006.
7. Nielsen, J. and S. Oliver, *The next wave in metabolome analysis*. Trends in Biotechnology, 2005. **23**(11): p. 544-546.
8. Eriksson, L., et al., *Using chemometrics for navigating in the large data sets of genomics, proteomics, and metabonomics (gpm)*. Anal Bioanal Chem, 2004. **380**(3): p. 419-29.
9. Beecher, C., ed. *The Human Metabolome in Metabolic Profiling: Its Role in Biomarker Discovery and Gene Function Analysis* ed. H.G.G. R. 2003, Kluvier Academic Publisher: Bostan. 311-319.
10. Lindon, J., et al., *So What's the Deal with Metabonomics*. Analytical Chemistry, 2003. **A**: p. 385-391.
11. Lindon, J.C., et al., *The handbook of metabonomics and metabolomics*. Edição de Elsevier ed. 2007. p. 561.
12. Oliver, S.G., et al., *Systematic functional analysis of the yeast genome*. Trends Biotechnol, 1998. **16**(9): p. 373-8.
13. Robertson, D.G., *Metabonomics in toxicology: A review*. Toxicological Sciences, 2005. **85**(2): p. 809-822.
14. Campbell, M.K., *Biochemistry*, ed. H.B. Company. 1999.
15. Adão, M.H., *Bioquímica*. 1997, Lisboa: Edições Técnicas.
16. Forster, J., et al., *Genome-scale reconstruction of the Saccharomyces cerevisiae metabolic network*. Genome Res, 2003. **13**(2): p. 244-53.
17. King, N.L., et al., *Analysis of the Saccharomyces cerevisiae proteome with PeptideAtlas*. Genome Biol, 2006. **7**(11): p. R106.
18. Piskur, J. and R.B. Langkjaer, *Yeast genome sequencing: the power of comparative genomics*. Molecular Microbiology, 2004. **53**(2): p. 381-389.
19. Holmes, E. and H. Antti, *Chemometric contributions to the evolution of metabonomics: mathematical solutions to characterising and interpreting complex biological NMR spectra*. Analyst, 2002. **127**(12): p. 1549-1557.
20. Bino, R.J., et al., *Potential of metabolomics as a functional genomics tool*. Trends in Plant Science, 2004. **9**(9): p. 418-425.
21. Mendes, P., *Emerging bioinformatics for the metabolome*. BRIEFINGS IN BIOINFORMATICS, 2002. **3**: p. 134-145.
22. Anderson, R.M., et al., *Nicotinamide and PNC1 govern lifespan extension by calorie restriction in Saccharomyces cerevisiae*. Nature, 2003. **423**(6936): p. 181-185.
23. Lin, S.J., et al., *Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in Saccharomyces cerevisiae*. Science, 2000. **289**(5487): p. 2126-2128.

24. Rezzi, S., et al., *Nutritional metabonomics: Applications and perspectives*. Journal of Proteome Research, 2007. **6**(2): p. 513-525.
25. Lenz, E.M. and I.D. Wilson, *Analytical strategies in metabonomics*. Journal of Proteome Research, 2007. **6**(2): p. 443-458.
26. Dumas, M.-E., et al., *Assessment of Analytical Reproducibility of ¹H NMR Spectroscopy Based Metabonomics for Large-Scale*. Analytical Chemistry, 2006. **7**: p. 2199-2208.
27. Gil, V.M.S. and C.F.G.C. Geraldes, *Ressonância Magnética Nuclear Fundamentos, Métodos e Aplicações*. 2 ed. 2002, Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian.
28. Burrows, H. and M. Pereira, *Química - Síntese e Estrutura, Uma Abordagem Prática*, ed. E. Editora. 2006, Lisboa.
29. Gonsalves, A.M.R. and T.M.V.D.P. Melo, *Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear*, ed. I.d.U.d. Coimbra. 2007, Coimbra: Imprensa da Universidade de Coimbra.
30. Viant, M.R., *Improved methods for the acquisition and interpretation of NMR metabolomic data*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2003. **310**(3): p. 943-948.
31. Bertram, H.C., et al., *Effect of magnetic field strength on NMR-Based metabonomic human urine data comparative study of 250, 400, 500, and 800 MHz*. Analytical Chemistry, 2007. **79**(18): p. 7110-7115.
32. Lindon, J.C., et al., *Pattern recognition methods and applications in biomedical magnetic resonance*. Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, 2001. **39**(1): p. 1-40.
33. Saude, E.J. and B.D. Sykes, *Urine stability for metabolomic studies: effects of preparation and storage*. Metabolomics, 2007. **3**(1): p. 19-27.
34. Wu, H.F., et al., *High-throughput tissue extraction protocol for NMR and MS-based metabolomics*. Analytical Biochemistry, 2008. **372**(2): p. 204-212.
35. Villas-Boas, S.G., et al., *Global metabolite analysis of yeast: evaluation of sample preparation methods*. Yeast, 2005. **22**(14): p. 1155-1169.
36. Dekoning, W. and K. Vandam, *A Method for the Determination of Changes of Glycolytic Metabolites in Yeast on a Subsecond Time Scale Using Extraction at Neutral Ph*. Analytical Biochemistry, 1992. **204**(1): p. 118-123.
37. Vaseghi, S., et al., *In vivo dynamics of the pentose phosphate pathway in Saccharomyces cerevisiae*. Metab Eng, 1999. **1**(2): p. 128-40.
38. Department of Cell Biology, A.E.C.o.M. 2009 [cited 20/06/09]; Available from: <http://mckeogh.googlepages.com/s.cerevisiaeresources>.
39. Burke, D., et al., *Methods in Yeast Genetics*. 2000 ed, ed. A.C.S.H.L.C. Manual. 1998.
40. Bocharova, N., et al., *Protein aggregation and neurodegeneration: Clues from a yeast model of Huntington's disease*. Biochemistry-Moscow, 2009. **74**(2): p. 231-234.
41. Prescott, et al., *Microbiology*. 6th Edition ed, ed. McGraw-Hill. 2005.
42. Wernerwashburne, M., et al., *Stationary-Phase in the Yeast Saccharomyces Cerevisiae*. Microbiological Reviews, 1993. **57**(2): p. 383-401.
43. Santos, M.A., et al., *Driving change: the evolution of alternative genetic codes*. Trends Genet, 2004. **20**(2): p. 95-102.

44. Santos, M.A.S., et al., *Selective advantages created by codon ambiguity allowed for the evolution of an alternative genetic code in Candida spp.* Molecular Microbiology, 1999. **31**(3): p. 937-947.
45. Miranda, I., et al., *Evolution of the genetic code in yeasts.* Yeast, 2006. **23**(3): p. 203-213.
46. Kell, D.B., *Systems biology, metabolic modelling and metabolomics in drug discovery and development.* Drug Discovery Today, 2006. **11**(23-24): p. 1085-1092.
47. Silva, R.M., et al., *Critical roles for a genetic code alteration in the evolution of the genus Candida.* Embo Journal, 2007. **26**(21): p. 4555-4565.
48. Bundy, G. and B. Papp, *Evaluation of predicted network modules in yeast metabolism using NMR-based metabolite profiling.* Genome Research, 2007. **17**(4): p. 510-519.
49. Lewis, I.A., et al., *Method for determining molar concentration of metabolites in complex solutions from two-dimensional ¹H-¹³C NMR.* Analytical chemistry 2007. **79**: p. 9385-9390.
50. CERMAX. *Centro de Ressonância Magnética António Xavier.* 2007 [cited 2008 14/10/08]; Available from: <http://cermax.itqb.unl.pt/>.
51. Goddard, T., *Sparky - NMR Assignment and Integration Software.* 2004: San Francisco.
52. Ulrich, E.L., et al., *BioMagResBank.* Nucleic Acids Res, 2008. **36**(Database issue): p. D402-8.
53. Vollhardt, K.P.C. and N.E. Schore, *Organic Chemistry: Structure and Function.* 4th edition ed. 2002: W H Freeman & Co.
54. Center, K.U.B., *KEGG Saccharomyces cerevisiae.* 1994.